

# LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION TFIIA: LOCALISATION ET INTERACTIONS

par

Andrés Rojas

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Mars 1999



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56964-0



Le 5 mars 1999, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.  
date

Président-rapporteur: M. Claude Déry  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre: M. Richard Blouin  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre: M. Benoit Coulombe  
Département de biologie

\_\_\_\_\_



## SOMMAIRE

Nous avons utilisé la méthode de N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking pour sonder la composition et la topologie d'un intermédiaire du complexe de pré-initiation de la transcription ("pre-initiation complex" ou PIC), le complexe ADN-TBP-TFIIA. Cette méthode permet de placer le nucléotide photoréactif N<sub>3</sub>R-dUMP à une position précise le long d'un brin d'ADN. Sous l'action de rayons UV, le groupement nitrène du nucléotide photoréactif formera un lien covalent avec les protéines à proximité. Cette méthode nous a permis de situer les polypeptides comprenant TBP et TFIIA le long d'un promoteur de type II: le promoteur Ad2ML. Nos résultats de pontage démontrent que les facteurs TBP et TFIIA entourent le promoteur sur une distance de deux tours et demi d'hélice, allant de la position -20 jusqu'à la position -48 sur le promoteur Ad2ML. La position relative des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de TFIIA a été établie. TFIIA $\beta$  se retrouve au niveau de la boîte TATA et immédiatement en amont de celle-ci entre les positions -29 et -42. TFIIA $\alpha$  est situé plus en amont de la boîte TATA, entre les positions -39 et -48. TFIIA $\gamma$  n'a pas été localisé dans le contexte d'un complexe contenant hTFIIA. Par contre, lorsqu'une préparation bTFIIA a été utilisée dans nos expériences de pontage, un polypeptide de  $M_r \sim 12$  kDa, identique à TFIIA $\gamma$ , a été ponté entre les positions -39 et -48.

L'étendue des contacts du complexe TBP-TFIIA sur le promoteur Ad2ML offre une grande région d'interaction avec d'autres FGTs, incluant l'ARN pol II, ou des facteurs de régulation de la transcription. Nous avons étudié l'interaction de TFIIA avec les autres membres du PIC par chromatographie d'affinité. Nos résultats démontrent que TFIIA interagit avec la grande sous-unité de TFIIIF, RAP74, et avec les deux sous-unités de TFIIIE, TFIIIE34 et TFIIIE56. Ces résultats nous permettent de proposer un mécanisme par lequel TFIIA agirait comme coactivateur. TFIIA pourrait servir ainsi de lien entre un activateur et les FGTs TFIIIE et TFIIIF. Par cette interaction physique, TFIIA pourrait agir sur les étapes impliquant ces facteurs tels l'enroulement de l'ADN autour du PIC, l'ouverture de l'hélice d'ADN et/ou l'élongation.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier sincèrement mon directeur de recherche, Benoit Coulombe, pour m'avoir permis de travailler sur ce projet. Je le remercie pour son enseignement, son encadrement et son aide constante permettant de mener ce projet de recherche à terme.

Je remercie également mes conseillers, Claude Déry et Richard Blouin pour leur conseils.

Finalement, je remercie mes collègues de travail, Diane Forget, François Robert, Caroline Piché, Sonia Santerre, Maxime Douziech et Christine Gagnon pour leur collaboration et l'ambiance de bonne humeur et de camaraderie qui régnait dans le laboratoire.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
INTRODUCTION.....	1
 CHAPITRE 1- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	 34
1.1. Facteurs de transcription.....	34
1.2. N <sub>3</sub> R-dUMP-photocross-linking.....	34
1.3. Interactions protéine-protéine.....	36
1.4. Gel de retardement de bande.....	37
1.5. Transcription <i>in vitro</i> .....	37
 CHAPITRE 2- RÉSULTATS.....	 39
2.1. Pontage des sous-unités de hTFIIA.....	39
2.2. Pontage des sous-unités de bTFIIA.....	44
2.3. Interactions de TFIIA avec les facteurs généraux de transcription.....	48
 CHAPITRE 3- DISCUSSION.....	 60
3.1. Structure du complexe ADN-yTBP-hTFIIA.....	60
3.2. bTFIIA est composé de trois sous-unités: $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ .....	64
3.3. TFIIA interagit avec des FGTs impliqués dans l'ouverture de l'hélice d'ADN.....	66
 CONCLUSION.....	 68
 BIBLIOGRAPHIE.....	 70

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
Ad2ML	<i>adenovirus 2 major late</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNt	ARN de transfert
ARN pol II	ARN polymérase de classe II
ARN pol IIa	forme déphosphorylée de l'ARN pol II
ARN pol IIo	forme phosphorylée de l'ARN pol II
bcd	<i>bicoid</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BSA	albumine sérique bovine
bTFIIA	TFIIA de thymus de veau (b:bovin)
cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cTBP ou cTFII	<i>core TBP</i> ou <i>core TFII</i>
CTD	<i>carboxy-terminal domain</i>
DHFR	dihydrofolate réductase
DNase I	désoxyribonucléase I
dTBP ou dTFII ou dTAF <sub>II</sub>	TBP ou TFII ou TAF <sub>II</sub> de drosophile
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	acide éthylène-bis(oxyéthylènenitrilo) tétraacétique
ERCC	<i>excision repair cross-complementing</i>
FGT	facteur général de transcription
Hb	<i>hunchback</i>
HEPES	acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)
hKb	<i>huckebein</i>
hTBP ou hTFII ou hTAF <sub>II</sub>	TBP ou TFII ou TAF <sub>II</sub> humain
HTH	<i>helix-turn-helix</i>

IgH	<i>immunoglobulin heavy chain</i>
Inr	<i>initiateur</i>
M <sub>r</sub>	<i>poids moléculaire</i>
N <sub>3</sub> R-dUMP	<i>5-[N-(p-azidobenzoyl)-3-aminoallyl]- déoxyuridine monophosphate</i>
NC2	<i>negative cofactor 2</i>
NURF	<i>nucleosome remodeling factor</i>
PC4	<i>positive cofactor 4</i>
PIC	<i>pre-initiation complex</i>
RAP	<i>RNA polymerase II-associated protein</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRB	<i>suppressor of RNA polymerase B</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
SWI/SNF	<i>SWI, mating-type switching; SNF, sucrose non-fermenting</i>
TAF <sub>II</sub>	<i>class II TBP-associated factor</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TFII	<i>class II transcription factor</i>
TBPr ou TFIIr	<i>TBP ou TFII recombinant</i>
topo I	<i>topoisomérase I</i>
UV	<i>ultraviolet</i>
VIH	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>
VP16	<i>viral protein 16</i>
yTBP ou yTFII ou yTAF <sub>II</sub>	<i>TBP ou TFII ou TAF<sub>II</sub> de levure</i>

## **LISTE DES TABLEAUX**

1. Composition et propriétés des FGTs humains..... 4



## LISTE DES FIGURES

1.	Modèle de la transcription par l'ARN pol II. . . . .	3
2.	Représentation schématique des sous-unités de hTFIIA. . . . .	26
3.	Sondes photoréactives dérivées du promoteur Ad2ML. . . . .	35
4.	Pontage de yTBP et de hTFIIA sur le promoteur Ad2ML. . . . .	41
5.	Spécificité du pontage de hTFIIA et de bTFIIA à la position -42 sur le promoteur Ad2ML. . . . .	43
6.	Pontage de yTBP et de bTFIIA sur le promoteur Ad2ML. . . . .	45
7.	Disparition du pontage de la sous-unité $\alpha$ de bTFIIA à la position -42 du promoteur Ad2ML par exposition de TFIIA à la chaleur. . . . .	47
8.	Chromatographie d'affinité. . . . .	50
9.	Effet dose-réponse de la liaison de TFIIA à RAP74. . . . .	59
10.	Modèle de la structure du complexe TBP-TFIIA-promoteur analysé par N <sub>3</sub> R-dUMP-photocross-linking. . . . .	61

## INTRODUCTION

### **La transcription: généralités.**

L'étude de l'expression génétique et de sa régulation touche à des domaines aussi variés que le développement embryonnaire et les maladies comme les infections virales ou les cancers. Lors du développement d'un embryon, les cellules se différencient pour remplir une fonction particulière dans un tissu spécialisé. Cette différenciation cellulaire n'est possible que si les cellules utilisent de manière spécifique le bagage génétique qu'elles ont en commun. Donc, certains gènes devront être exprimés, et d'autres pas, dépendant de la cellule en question et des signaux qu'elle reçoit. La régulation adéquate de l'expression génétique est importante au bon fonctionnement de la cellule tout le long de son existence. Des aberrations de celle-ci peuvent causer diverses maladies dont des cancers. L'expression des gènes viraux est également régulée et déterminera le déroulement de l'infection.

L'expression d'un gène se traduit par la production d'une protéine pour laquelle il code. Il existe plusieurs étapes menant à la production d'une protéine. La cellule reçoit un signal qui est acheminé, via une cascade d'événements biochimiques, jusqu'au noyau et qui sera suivie de la transcription du gène en ARNm, puis la traduction de ce dernier en protéine et à sa maturation. Nous ne nous attarderons ici que sur l'étape de la transcription du gène en ARNm et sa régulation dont l'étude nous permettra de mieux comprendre les phénomènes que je viens de mentionner.

La transcription des gènes eucaryotes est effectuée par trois ARN polymérases (ARN pol), soit l'ARN pol I, II et III. Chacune transcrit une série particulière de gènes. L'ARN pol I transcrit les gènes codant pour les gros ARN ribosomiaux. L'ARN pol III transcrit les gènes codant pour les ARNt et l'ARN ribosomal 5S. L'ARN pol II transcrit

les gènes codant pour les protéines en plus de certains petits ARNs nucléaires, excepté l'ARN U6 qui est transcrit par l'ARN pol III (Zawel et Reinberg, 1993). Pour transcrire un gène, les ARN pol doivent se positionner en amont du site d'initiation de la transcription sur une séquence nommée promoteur. La nature des promoteurs varie selon la classe d'ARN pol qui s'y lie et peut varier aussi à l'intérieur d'une même classe. Contrairement à l'ARN pol procaryote, les ARN pol eucaryotes ne sont pas capables de reconnaître spécifiquement le promoteur d'un gène par elles-mêmes. Dans un système de transcription reconstitué *in vitro*, l'ARN pol II purifiée synthétisera des transcrits de manière non-spécifique à partir de différents sites sur l'ADN tels des brisures ou les extrémités. Par contre un extrait nucléaire brut, contenant l'ARN pol II, supporte la synthèse d'ARN correctement initiés à partir d'un promoteur (Weil *et al.*, 1979). Cette observation a permis de conclure qu'un extrait nucléaire contient divers facteurs protéiques nécessaires à l'initiation de la transcription. Au début des années 80, plusieurs laboratoires se sont mis à la tâche d'isoler ces différents facteurs. Leur purification s'est faite en suivant la capacité des diverses fractions chromatographiques à reconstituer la transcription *in vitro*, en présence de l'ARN pol II. Les facteurs contenus dans ces fractions protéiques indispensables à la transcription, dite basale, ont été appelés facteurs généraux de transcription (Matsui *et al.*, 1980). La nature de ces FGTs change d'une ARN pol à l'autre. Six FGTs ont été identifiés pour l'ARN pol II: TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH (pour une revue récente voir Orphanides *et al.*, 1996). Ces facteurs ont été purifiés à partir de différentes sources et leur composition a été caractérisée. La plupart ont été clonés. Ces facteurs s'assemblent sur le promoteur et recrutent l'ARN pol II pour former le PIC. Il n'est pas encore clair si dans la cellule ces facteurs s'assemblent séquentiellement sur l'ADN ou s'ils sont pré-assemblés en solution (Orphanides *et al.*, 1996). La transcription peut être modélisée en plusieurs étapes séparées dans le temps (figure 1). Le PIC est d'abord assemblé au promoteur. Cette étape est suivie de l'initiation de la synthèse d'ARN, de l'élongation du brin d'ARN puis de la terminaison de la transcription. Chaque étape peut être divisée en diverses sous-étapes. La purification et le clonage des FGTs a permis aux chercheurs de sonder, par différents systèmes *in vitro* et *in vivo*, le rôle de chacun d'eux lors des diverses étapes de la transcription (tableau 1)



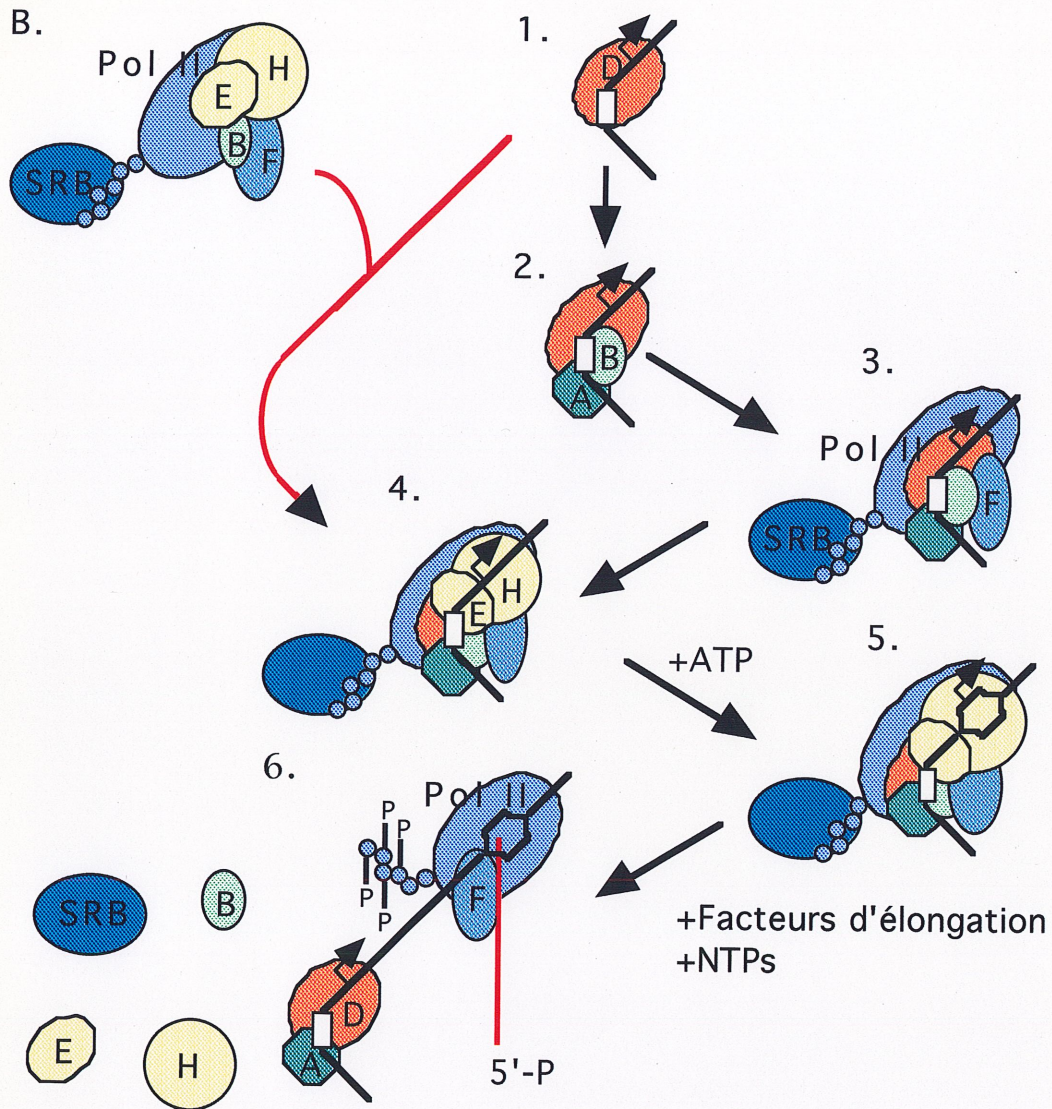


Figure 1. Modèle de la transcription par l'ARN pol II. Le promoteur est reconnu par le facteur TFIID (1) et stabilisé par TFIIA et TFIIB (2). Ce dernier sert de pont d'attache au recrutement du complexe TFIIF-ARN pol II (3). L'entrée de TFIIE et TFIIH (4) permet l'ouverture de l'hélice d'ADN en présence d'ATP (5). L'ARN pol II initie la transcription en présence de nucléotides et se détache du promoteur, après phosphorylation de la queue C-terminale (p), pour allonger le brin d'ARN. TFIID et TFIIA demeurent au promoteur (6). Une autre voie d'assemblage du PIC prévoit l'arrimage de l'holoenzyme au complexe ADN-TFIID en une seule étape (B).

**Tableau 1. Composition et propriétés des FGTs humains.**

FGT	Sous-unités	Propriétés
TFIIA	35 kDa ( $\alpha$ ) 19 kDa ( $\beta$ ) 12 kDa ( $\gamma$ )	Stimule la liaison de TBP à la boîte TATA. Nécessaire à l'activation.
TFIIB	35 kDa	Recrute l'ARN pol II/TFIIF. Important à la sélection du site +1.
TFIID	38 kDa (TBP) 18-250 kDa (TAFs)	Lie la boîte TATA et courbe le promoteur. Coactivateurs nécessaires à l'activation.
TFIIE	56 kDa ( $\alpha$ ) 34 kDa ( $\beta$ )	Rôle dans l'enroulement et l'ouverture de l'hélice d'ADN. Recrute TFIIH.
TFIIF	58 kDa (RAP74) 26 kDa (RAP30)	Rôle dans l'initiation et l'élongation. Rôle dans l'enroulement et l'ouverture de l'hélice d'ADN.
TFIIH	32-89 kDa (9 S-U)	Activités hélicases (ERCC2 et ERCC3). Activité CTD-kinase (cdk7/cycline H).

### **Reconnaissance du promoteur.**

Les promoteurs de classe II varient beaucoup d'une famille de gènes à l'autre mais ils ont une caractéristique commune, celle d'avoir une séquence reconnue spécifiquement par un ou plusieurs FGTs possédant un domaine de liaison à l'ADN. Deux séquences d'ADN pouvant servir à la reconnaissance spécifique du promoteur ont été identifiées. Il s'agit de la boîte TATA, placée généralement de 25 à 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription (site +1), et l'Inr qui



chevauche le site +1. Certains promoteurs contiennent l'un ou l'autre ou les deux éléments à la fois. TFIID est le facteur reconnaissant spécifiquement la boîte TATA et l'Inr (Davison *et al.*, 1983; Sawadogo et Roeder, 1985). L'activité de liaison spécifique à la boîte TATA est intrinsèque à la sous-unité TBP. En plus de TBP, TFIID comprend plusieurs polypeptides nommés TAF<sub>II</sub>s dont le M<sub>r</sub> varie de 18 à 250 kDa (Dynlacht *et al.*, 1991; Tanese *et al.*, 1991). Ceux-ci ne sont pas requis pour la transcription basale mais sont nécessaires à l'activation *in vitro*. L'un d'eux, TAF<sub>II</sub>150, reconnaît l'Inr, possiblement avec l'aide de TAF<sub>II</sub>250 et/ou d'autres facteurs liant l'Inr tel TFII-I et l'ARN pol II (Verrijzer *et al.*, 1994; Verrijzer *et al.*, 1995; Smale, 1997).

TBP est composé d'un domaine N-terminal peu conservé et d'un domaine C-terminal hautement conservé. Ce seul domaine C-terminal est nécessaire et suffisant à la reconnaissance de la boîte TATA (Peterson *et al.*, 1990). La liaison de TBP à la boîte TATA est jugée la seule interaction protéine-ADN spécifique indispensable à la formation du PIC, les autres FGTs s'y joignant surtout via des interactions protéine-protéine. Ainsi, suite à l'arrivée de TBP au promoteur, TFIIA se lie à TBP et stabilise sa liaison à l'ADN (Buratowski *et al.*, 1989; Coulombe *et al.*, 1992). Le rôle de TFIIA en transcription sera l'objet de toute une section ultérieure.

### **Recrutement de l'ARN pol II.**

Dans le modèle séquentiel de la formation du PIC, TFIIB entre à la suite de TFIID (Buratowski *et al.*, 1989; Maldonado *et al.*, 1990). Tout comme TFIIA, il stabilise la liaison de TBP au promoteur (Imbalzano *et al.*, 1994a). Il joue d'autres rôles importants. Il sert de pont entre la reconnaissance du promoteur et le recrutement de l'ARN pol II. Ainsi TFIIB interagit à la fois avec TBP, l'ARN pol II et TFIIF (Ha *et al.*, 1993), ce dernier se complexant avec l'ARN pol II en solution et l'amenant au complexe TBP-TFIIB-ADN (Flores *et al.*, 1991).

Un autre rôle de TFIIB consiste à positionner adéquatement l'ARN pol II au site +1 et ainsi permettre l'initiation de la transcription à cet endroit. L'évidence la plus directe provient d'expériences génétiques. Des mutations dans le gène de levure *SUA7* codant pour TFIIB provoque un changement dans le site +1 *in vivo* (Pinto *et al.*, 1992; Pinto *et al.*, 1994). Des mutations dans la grosse sous-unité de l'ARN pol II ont le même effet, suggérant que l'interaction entre TFIIB et l'ARN pol II est fonctionnellement indispensable à la reconnaissance du site +1 (Sun *et al.*, 1996). Une autre évidence indirecte de l'importance de l'interaction TFIIB-ARN pol II dans le choix du site +1 vient de l'étude de deux systèmes de transcription *in vitro*, celui de *Saccharomyces cerevisiae* et celui de *Saccharomyces pombe* (Li *et al.*, 1994). Individuellement TFIIB et l'ARN pol II de *S. pombe* ne sont pas interchangeables avec les mêmes composantes de *S. cerevisiae*. Par contre, elles sont interchangeables en paire. L'échange de ces composantes de *S. pombe* à un système chez *S. cerevisiae* amène une variation du site +1 allant de celui normalement observé chez *S. cerevisiae* au site +1 chez *S. pombe*. Ces études démontrent que TFIIB et l'ARN pol II sont nécessaires à la sélection du site +1 (Li *et al.*, 1994). TFIIF est composé de deux sous-unités: RAP30 et RAP74. Récemment, la sous-unité RAP74 de TFIIF a été impliquée dans la sélection du site +1 car des mutations dans le gène de RAP74 de levure suppriment une mutation dans TFIIB rétablissant ainsi le site +1 normal (Sun et Hampsey, 1995). De plus, RAP74 semble induire une réorganisation du PIC rapprochant l'ARN pol II de l'ADN près des positions -19, -39/-40 du promoteur Ad2ML (Forget *et al.*, 1997).

L'ARN pol II est composée de 8 à 12 sous-unités, selon l'espèce, dont deux, de Mr de 180 et 140 kDa, sont hautement conservées (Zawel et Reinberg, 1993). L'ARN pol II lie TFIIF en solution et le complexe TFIIF-ARN pol II est recruté au promoteur (Flores *et al.*, 1991; Wang et Burton, 1995). TFIIF est requis au recrutement de l'ARN pol II à tous les promoteurs, à l'exception de celui du gène de la chaîne lourde des IgH (Parvin et Sharp, 1993). La sous-unité RAP30 de TFIIF est suffisante pour permettre l'association de l'ARN pol II au complexe TFIID-TFIIB ou TFIID-TFIIA-TFIIB (Flores *et al.*, 1991; Tyree *et al.*, 1993), et ce, via une interaction entre RAP30 et TFIIB. TBP, TFIIB et RAP30 sont les facteurs qui sont minimalement requis pour recruter l'ARN pol II sur la majorité des promoteurs (Killeen *et al.*, 1992). Dans un

cas cependant, la transcription est possible simplement avec les facteurs TFIIB, YY1 et l'ARN pol II (Usheva et Shenk, 1994). TFIIA n'est pas nécessaire au recrutement de l'ARN pol II étant donné qu'un complexe DBP $\alpha$ IF peut s'assembler en présence ou en absence de TFIIA (Killeen *et al.*, 1992).

### **Ouverture de l'hélice d'ADN et initiation de la transcription.**

Deux autres facteurs, TFIIE et TFIIH, sont requis pour l'initiation de la transcription. TFIIE lie l'ARN pol II sur le promoteur et recrute TFIIH (Maxon *et al.*, 1994). Pour obtenir l'initiation de la transcription, c'est-à-dire formation du premier lien phosphodiester, il doit y avoir préalablement ouverture de l'hélice d'ADN au niveau du site +1. Cette étape nécessite la présence des facteurs TFIIE, TFIIF, TFIIH et de l'hydrolyse d'ATP (Pan et Greenblatt, 1994; Timmers, 1994; Holstege *et al.*, 1995; Holstege *et al.*, 1996). TFIIH est un facteur polypeptidique contenant deux activités hélicases ATP-dépendantes et une activité kinase. Les activités hélicases sont contenues dans les sous-unités ERCC2 et ERCC3 de TFIIH, mais seul ERCC3 est essentiel à la transcription (Guzder *et al.*, 1994; Orphanides *et al.*, 1996). ERCC3 est donc le facteur requérant de l'énergie lors de la transcription des gènes de type II. Le rôle de TFIIH dans l'ouverture de l'hélice d'ADN est fonction de cette activité hélicase qui provoque une séparation des brins d'ADN et crée ainsi une région d'ADN simple brin propice à l'initiation de la transcription (Holstege *et al.*, 1996). Quant à TFIIE, en plus de permettre le recrutement de TFIIH au promoteur, il stimule les activités enzymatiques de TFIIH mais semble aussi agir d'une manière indépendante de TFIIH (Lu *et al.*, 1992; Timmers, 1994; Goodrich et Tjian, 1994; Holstege *et al.*, 1995). TFIIE stabilise l'ADN sous forme simple brin dans la région désappariée au niveau du site +1 (Holstege *et al.*, 1995). Une autre évidence du rôle de TFIIE, TFIIH et de l'hydrolyse de l'ATP dans l'ouverture de l'hélice réside dans le fait qu'aucun de ces facteurs n'est requis pour transcrire une matrice d'ADN surenroulée (Parvin et Sharp, 1993; Tantin et Carey, 1994; Goodrich et Tjian, 1994; Timmers, 1994; Holstege *et al.*, 1996). Il est postulé que l'énergie libre emmagasinée dans le surenroulement permet à elle seule l'ouverture de l'hélice d'ADN (Parvin et Sharp, 1993; Timmers, 1994). Il a été proposé que TFIIE et TFIIF stimulent l'ouverture de



l'hélice d'ADN en provoquant un enroulement de l'ADN autour de l'ARN pol II (Forget *et al.* 1997; Robert *et al.*, 1998). Ceci causerait une tension séparant les deux brins d'ADN pour que l'hélicase simple-brin de TFIIH puisse agir. En accord avec un rôle possible de TFIIIE et TFIIIF dans l'ouverture de l'hélice d'ADN, la petite sous-unité de TFIIIE, TFIIIE34, et la grande sous-unité de TFIIIF, RAP74, ont été pontées tout juste en amont du site +1 du promoteur Ad2ML (Robert *et al.*, 1996). L'initiation de la transcription se produit donc en deux étapes au moins. La première, qui est ATP-dépendante, est l'ouverture de l'hélice dans la région -9/+1. La deuxième étape correspond à la formation du premier lien phosphodiester et coïncide avec l'allongement de la région désappariée jusqu'à la position +8 sur le promoteur Ad2ML (Holstege *et al.*, 1996).

### **Dégagement du promoteur.**

La transition entre l'initiation de la transcription et l'élongation du transcrit nécessite que l'ARN pol II quitte le promoteur suffisamment pour permettre l'assemblage d'un nouveau PIC. Ce phénomène est appelé le dégagement du promoteur. Cette transition implique une modification covalente de l'ARN pol II soit la phosphorylation du CTD de la grosse sous-unité de l'ARN pol II (pour une revue récente voir Dahmus, 1995). Le CTD possède de multiples répétitions de l'heptapeptide Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, le nombre de ces répétitions variant d'une espèce à l'autre. Une évidence corrélant la phosphorylation du CTD au dégagement du promoteur est que l'ARN pol II se retrouve dans des complexes en phase d'élongation tandis que l'ARN pol IIa s'associe au complexe de préinitiation (Laybourn et Dahmus, 1990; Lu *et al.*, 1991). De plus cette phosphorylation diminue l'affinité du domaine CTD pour TBP et TFIIIE, ce qui libère l'ARN pol II d'interactions la retenant au promoteur (Usheva *et al.*, 1992; Maxon *et al.*, 1994). TFIIH possède une activité kinase spécifique au CTD et est donc un candidat pour la phosphorylation de ce dernier, fournissant une évidence du rôle de TFIIH dans le dégagement du promoteur. La kinase associée à TFIIH, cdk7 ou MO15 chez les mammifères et KIN28 chez la levure, est une kinase cycline-dépendante (Orphanides *et al.*, 1996). Le rôle de la phosphorylation du CTD reste difficile à définir. Le CTD est essentiel pour la viabilité

de la cellule (Zehring *et al.*, 1988) mais n'est pas toujours requis pour reconstituer la transcription *in vitro*. Ainsi le CTD n'est pas requis pour la transcription à partir du promoteur Ad2ML contrairement au promoteur de DHFR de souris (Akoulitchev *et al.*, 1995). La dépendance de la transcription au CTD semble corrélée avec l'absence d'une boîte TATA dans le promoteur (Buermeier *et al.*, 1995).

### **Élongation.**

L'élongation est le phénomène par lequel la chaîne d'ARN naissante est allongée sur la longueur totale du gène. L'ARN pol II transcrit de façon discontinue pausant ou s'arrêtant à différents endroits. Ces bloquages de la transcription peuvent être causés par des séquences d'ADN particulières reconnues par l'ARN pol II, des complexes protéiques liant l'ADN, des nucléosomes ou même un manque de nucléotides (Maldonado et Reinberg, 1995). Un certain nombre de protéines permettent à l'ARN pol II de passer outre les sites de pause et d'arrêt. Ces protéines sont des facteurs d'élongation. Cinq facteurs ont jusqu'ici été identifiés. Il s'agit de P-TEFb, TFIIS (SII), élongine (SIII), ELL et TFIIF (Reines *et al.*, 1996).

TFIIF est un cas unique parmi les FGTs car il est le seul à jouer un rôle à la fois dans l'initiation et dans l'élongation de la transcription, si l'on exclut le rôle de TFIIH dans le dégagement du promoteur (Reines *et al.*, 1996). En fait les domaines de RAP74 et RAP30 nécessaires à l'initiation sont différents de ceux impliqués dans l'élongation (Kephart *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 1995). Le rôle de TFIIF dans l'élongation est de permettre à l'ARN pol II de passer outre les sites de pause. Il diminue la fréquence de pause de l'ARN pol II et protège l'enzyme des arrêts éventuels (Reines *et al.*, 1996). Le mécanisme d'action de TFIIF dans l'élongation est encore mal compris. Il est convenu que TFIIF doit interagir avec le complexe d'élongation pour accomplir sa fonction. Cette interaction n'est que temporaire car TFIIF n'est pas associé à l'ARN pol II durant l'élongation (Price *et al.*, 1989; Zawel *et al.*, 1995). Possiblement, TFIIF n'est recruté au complexe d'élongation que lorsque ce dernier est en pause. Ce recrutement au complexe pausé est possiblement

régulé par la phosphorylation de RAP74. Ainsi Kitajima *et al.* (1994) ont montré une corrélation entre le niveau de phosphorylation de RAP74 et sa capacité à lier l'ARN pol II et à stimuler l'élongation. Il est intéressant de noter que la sous-unité TAF<sub>II</sub>250 de TFIID possède une activité kinase spécifique à RAP74 (Dikstein *et al.*, 1996). Lorsque l'ARN pol II se dégage du promoteur le PIC se dissocie. Seul TFIID reste associé au promoteur tandis que tous les autres facteurs sont relâchés l'un après l'autre durant l'élongation du transcrit (Zawel *et al.*, 1995). Suite à son relâchement TFIIB pourra se réassocier à TFIID au promoteur et permettra la formation d'un nouveau PIC et un nouveau cycle de transcription.

### **Holoenzyme.**

Le concept selon lequel les FGTs s'assemblent séquentiellement sur le promoteur pour former le PIC a été remis en question récemment par la purification chez la levure de complexes comprenant l'ARN pol II, un certain nombre de FGTs et des protéines SRB et capable de médier la transcription *in vitro* (Koleske et Young, 1994; Kim *et al.*, 1994b). Ces complexes préassemblés en solution ont été appelés holoenzymes (pour une revue récente voir Greenblatt, 1997). Les protéines SRB ont été isolées génétiquement par le groupe de Young en criblant des mutations dans des gènes capables de supprimer un phénotype température-sensible dû à un tronquage du CTD. Il a été trouvé que ces protéines SRB se retrouvent associées à une sous-population de molécules d'ARN pol II (Thompson *et al.*, 1993; Koleske et Young, 1994). L'équipe de Kornberg a également isolé une holoenzyme de façon biochimique. Un complexe capable de médier l'activation par différents activateurs (voir section suivante), dans un système de transcription *in vitro* reconstitué avec des facteurs homogènes et l'ARN pol II, a été isolé et baptisé le médiateur. Celui-ci est associé à l'ARN pol II via le CTD et comprend un sous-ensemble de FGTs ainsi que certaines protéines SRB (Kim *et al.*, 1994b). Il semble qu'il existe au moins deux formes d'holoenzymes chez la levure. La première est celle isolée dans les laboratoires de Richard Young et de Roger Kornberg, et dont la marque de commerce est la présence de protéines SRB. La composition de ces holoenzymes varie beaucoup selon la méthode de purification utilisée mais invariablement on y

retrouve TFIIF, SRB2, SRB4, SRB5 et SRB6 et un certain nombre de polypeptides additionnels dont Gal11p, Rgr1p et de Sin4p (Chang et Jaehning, 1997). Il a aussi été montré que l'holoenzyme peut inclure TBP, TFIIB, TFIIF et le complexe SWI/SNF (Thompson *et al.*, 1993; Koleske et Young, 1994; Wilson *et al.*, 1996). La deuxième forme d'holoenzyme inclut certaines protéines mentionnées telles que TFIIB, TFIIF et Gal11p et également Paf1p et Cdc73p mais ne contient pas de protéines SRB (Wade *et al.*, 1996). Les deux formes d'holoenzyme coexistent dans la levure (Shi *et al.*, 1997). Il est possible que chaque holoenzyme soit requise pour la transcription d'un groupe différent de gènes. Ainsi l'holoenzyme comprenant des protéines SRB serait nécessaire à la transcription de la majorité des gènes puisque les gènes de certaines protéines SRBs sont essentiels pour la levure et affectent la synthèse de la majorité des transcrits (Thompson et Young, 1995). Par contre les gènes codant pour PAF1, CDC73 ainsi que pour des composantes communes GAL11, SIN4 et RGR1 sont tous non-essentiels et affectent la transcription d'un certain nombre de gènes seulement (Chang et Jaehning, 1997).

Chez les mammifères, diverses holoenzymes ont été purifiées à partir du foie de rat, du thymus de veau et de cellules Hela. Leur composition varie mais, contrairement aux holoenzymes de levure, l'holoenzyme purifiée à partir du foie de rat et une forme d'holoenzyme de cellules Hela contient tous les FGTs, incluant TBP et les TAF<sub>II</sub>s mais excluant TFIIA (Ossipow *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1997).

L'holoenzyme est-elle la forme active en transcription *in vivo*? Vu le nombre d'interactions entre les FGTs il n'est pas surprenant de retrouver un groupe d'entre eux réunis en solution. Il a aussi été démontré que des gènes codant pour les SRBs sont essentiels à la viabilité de la cellule et sont pratiquement tous liés à l'ARN pol II dans la cellule. Par contre le pourcentage de molécules d'ARN pol II qui sont associées à l'holoenzyme dans la cellule est relativement faible. Certains laboratoires estiment de 2% à 6% la quantité d'ARN pol II associée aux protéines SRBs (Thompson *et al.*, 1993; Koleske et Young, 1994) tandis que d'autres l'estiment plutôt à 50% (Kim *et al.*, 1994b). Étant donné que le facteur TFIID n'est pas retrouvé dans toutes les holoenzymes, on peut envisager que la formation du

PIC se déroule en deux étapes. La première est la reconnaissance du promoteur par TFIID ou TFIID-TFIIA et la deuxième est l'assemblage de l'holoenzyme par sa liaison à TFIID (Koleske et Young, 1995) (figure 1). La vision de l'assemblage du PIC a été bouleversée par le modèle de l'holoenzyme selon lequel une grande partie des FGTs nécessaires à l'initiation s'assemblent en solution. Particulièrement intéressantes sont les implications face à la régulation de la transcription que nous verrons dans la prochaine section.

### **Activation.**

Des facteurs protéiques contrôlent le niveau d'expression des gènes de manière spécifique. Ces facteurs peuvent moduler le niveau d'activité de l'ARN pol II de façon positive ou négative et sont respectivement appelés activateurs ou répresseurs. L'effet de ces facteurs de régulation peut être reproduit dans des systèmes de transcription *in vivo* et *in vitro* permettant ainsi l'étude de la régulation de la transcription.

Le modèle de la transcription tel qu'il est conçu aujourd'hui comporte plusieurs étapes sur lesquelles un activateur peut agir. Le modèle actuel de l'activation implique aussi des interactions directes entre un domaine d'activation et un ou des FGTs. Il y aurait corrélation, dans la plupart des cas, entre la capacité d'un activateur à lier un FGT et sa fonction d'activateur. Un activateur peut lier plusieurs FGTs à la fois. La question est de savoir quelle interaction est significative.

### **Structure d'un activateur.**

Habituellement un activateur possède une structure modulaire, c'est-à-dire qu'il existe au niveau de la protéine des domaines fonctionnels distincts et indépendants. Les activateurs ont généralement un domaine de liaison à l'ADN essentiel à la

liaison de l'activateur sur son promoteur cible. Une comparaison entre les séquences de divers facteurs de transcription révèle certains motifs communs responsables de la liaison à l'ADN. La structure de ces familles de motifs a été bien caractérisée. Il est possible de classer ces motifs structuraux dans les familles des motifs HTH, bHLH, et "zinc-finger" (Nelson, 1995). Certains activateurs sont recrutés au gène-cible via des interactions avec d'autres protéines déjà liées à l'ADN. C'est le cas de l'activateur VP16, du virus de l'herpès, qui lie le facteur Oct. D'autres encore ne lient pas l'ADN mais l'ARN tel Tat. Deux types d'éléments d'ADN séquence-spécifiques contiennent des sites de liaison pour des activateurs. Le premier est un élément promoteur-proximal et est situé entre 50 et quelques centaines de paires de bases du site +1. Le deuxième est appelé "enhancer". Un "enhancer" agit indépendamment de son orientation et de la distance à laquelle il est situé par rapport au site +1. Ainsi il peut être placé à plusieurs kilobases en amont ou en aval du site +1. Il peut aussi être intrinsèque au gène.

Les activateurs possèdent aussi une région responsable d'élever le niveau de transcription d'un gène: le domaine d'activation. Il est possible de fusionner un domaine d'activation à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue et de reproduire l'effet de la protéine entière dans des systèmes de transcription *in vitro* et *in vivo*. Les domaines d'activation sont moins connus structurellement. Ils sont généralement classés sur la base de leur composition en acides aminés. Il existe des domaines d'activation riches en acides aminés acides ou en glutamine ou en proline ou encore en sérine/thréonine. Des domaines d'activation riches en isoleucine ou en acides aminés basiques ont aussi été décrits (Triezenberg, 95). De la même façon, les domaines répresseurs sont classés par le type d'acides aminés dont ils sont composés. Des domaines répresseurs riches en alanine, glutamine et/ou proline ont été identifiés (Cowell, 1994). Les domaines d'activation doivent interagir directement ou indirectement avec la machinerie transcriptionnelle afin de moduler le niveau de transcription. De quelle manière ces domaines activateurs et répresseurs peuvent-ils agir sur le PIC? Des ébauches de réponse seront envisagées ci-bas.

## Coactivateurs.

Il est intéressant de noter que malgré le nombre important d'interactions directes décrites entre des domaines d'activation et des FGTs, l'activation nécessite d'autres facteurs appelés coactivateurs. Les coactivateurs font le lien entre l'activateur et la machinerie transcriptionnelle basale et permettent d'atteindre des niveaux transcriptionnels plus élevés. Il existe différents coactivateurs, soit gène-spécifique ou plus généraux. Une famille de coactivateurs généraux sur laquelle je vais m'attarder est celle des TAF<sub>II</sub>s. Les TAF<sub>II</sub>s sont associés de façon stable à TBP *in vivo* pour former le FGT TFIID. Les TAF<sub>II</sub>s ont été isolés à la fois chez l'humain, la drosophile et la levure (pour une revue récente voir Burley et Roeder, 1996). Ils sont au nombre de huit ou plus et ont pour la plupart un homologue chez les trois espèces. Certains TAF<sub>II</sub>s sont indispensables à la viabilité de la cellule chez les eucaryotes. Ils ne sont pas nécessaires pour reconstituer la transcription basale *in vitro* mais sont nécessaires à l'activation *in vitro* médiée par un activateur. Ainsi des expériences utilisant divers activateurs indiquent que TBPr ne peut se substituer au facteur TFIID partiellement purifié pour diriger l'activation (Hoey *et al.*, 1990; Pugh et Tjian, 1990; Dynlacht *et al.*, 1991). Un coactivateur fait le pont entre un activateur gène-spécifique et la machinerie transcriptionnelle générale. Pour ce faire le coactivateur doit interagir à la fois avec un activateur et un ou des FGTs. Par exemple, TAF<sub>II</sub>40 interagit à la fois avec TFIIB et VP16 (Goodrich *et al.*, 1993).

Le clonage de la plupart des TAF<sub>II</sub>s de drosophile a permis de reconstituer une activité TFIID *in vitro* permettant de montrer que différentes combinaisons de coactivateurs sont utilisées par des activateurs différents pour médier l'activation. Le facteur NTF-1 nécessite le complexe TBP-TAF<sub>II</sub>250-TAF<sub>II</sub>150 pour agir tandis que Sp1 nécessite en plus une interaction avec TAF<sub>II</sub>110 (Chen *et al.*, 1994). Il est donc possible que l'expression d'un gène, spécifique à un tissu, soit causée par la différence d'expression des TAF<sub>II</sub>s aussi bien que celle des activateurs d'un tissu à l'autre. L'interaction entre différents activateurs et des TAF<sub>II</sub>s est également nécessaire à l'effet de synergie observée lors de l'activation de la transcription (Sauer *et al.*, 1995a,b).

Dernièrement, l'absolue nécessité des TAF<sub>II</sub>s pour médier l'activation a été remise en cause par deux équipes soit celle de Kevin Struhl et celle de Michael Green. Ces chercheurs ont montré que l'inactivation de certains TAF<sub>II</sub>s n'affecte pas la transcription de la plupart des gènes en réponse à des activateurs. Cette observation est particulièrement surprenante puisque l'un des TAF<sub>II</sub>s inactivés dans ces études, TAF<sub>II</sub>145, l'homologue, chez la levure, de hTAF<sub>II</sub>250, un TAF<sub>II</sub> considéré comme essentiel à la formation du facteur TFIID, et le seul connu pour lier yTBP (Reese *et al.*, 1994). Ces deux groupes concluent que, généralement, l'activation de la transcription *in vivo* peut se faire en absence des TAF<sub>II</sub>s (Walker *et al.*, 1996; Moqtaderi *et al.*, 1996). Moqtaderi *et al.* (1996) ont de plus montré que l'inactivation des TAF<sub>II</sub>s affecte la croissance cellulaire et réduit la transcription de gènes possédant un promoteur avec un élément TATA non-consensus. Il est donc possible que, chez la levure, les TAF<sub>II</sub>s soient requis pour l'activation de certains gènes seulement, dont ceux impliqués dans la croissance cellulaire et possiblement ceux contenant un élément TATA faible ou ne contenant pas de boîte TATA. De plus, il existe des cas d'activation TAF<sub>II</sub>-indépendante chez les eucaryotes supérieurs et chez la levure. C'est le cas par exemple de l'activation de l'holoenzyme ne contenant pas de TAF<sub>II</sub>s (Koleske et Young, 1994; Kim *et al.*, 1994b). Il se peut qu'il existe plusieurs voies d'activation dépendamment du gène, et faisant appel aux TAF<sub>II</sub>s ou à d'autres co-facteurs notamment ceux contenus dans l'holoenzyme.

Les TAF<sub>II</sub>s sont-ils nécessaires à l'activation *in vivo* chez les eucaryotes supérieurs? Cette question a été étudiée chez la drosophile par l'équipe du Dr. Tjian. Sauer *et al.* (1996) qui ont isolé deux allèles mutantes des gènes codant pour dTAF<sub>II</sub>110 et dTAF<sub>II</sub>60. *In vitro*, ces deux protéines mutantes n'interagissent pas normalement avec leurs partenaires habituels et ne peuvent donc pas s'associer au complexe TFIID *in vivo*. Ces TAF<sub>II</sub>s mutants ont aussi été testés *in vivo* pour leur capacité à médier l'activation des gènes *hunchback* (hb) et *huckebein* (hkb) par l'activateur *bicoid* (bcd). Il avait déjà été démontré, *in vitro*, que bcd interagissait à la fois avec TAF<sub>II</sub>110 et TAF<sub>II</sub>60 et que ces interactions étaient nécessaires à son activité (Sauer *et al.*, 1995a,b). Des embryons de drosophile portant une allèle mutante pour l'un ou l'autre des TAF<sub>II</sub>s ont des niveaux réduits de transcription des gènes hb et hkb. Ces



résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les TAF<sub>II</sub>s sont requis pour l'activation *in vivo* et que différents TAF<sub>II</sub>s sont la cible d'activateurs divers.

### **L'anti-répression.**

*In vivo*, l'ADN génomique est compacté en une structure appelée la chromatine. Dans la chromatine, l'ADN est associé à plusieurs protéines dont les histones et d'autres protéines dites non-histones. L'ADN complexé aux histones forme une unité structurale: le nucléosome. Le nucléosome est composé d'un octamère d'histones, soit une paire de chacun des histones H2A, H2B, H3 et H4, reliés à l'histone H1. L'ADN s'enroule deux fois autour de ce noyau octamérique, ce qui englobe 146 paires de bases (pour une revue voir Paranjape *et al.*, 1994). L'ADN ainsi enroulé autour du noyau d'histones est inaccessible aux facteurs de transcription. L'assemblage de nucléosomes *in vitro* réprime la transcription, à moins que TBP ou TFIID soit préalablement associé au promoteur (Workman et Roeder, 1987). Il a été démontré que les régions actives transcriptionnellement sont dépouillés d'histones H1 (Paranjape *et al.*, 1994). De plus, dans un système de transcription *in vitro* reconstitué avec de la chromatine, l'ajout d'histones H1 inhibe la transcription basale (Laybourn et Kadonaga, 1991). L'effet de la chromatine sur la transcription en est donc un de répression. Certains activateurs et/ou coactivateurs agissent en contrecarrant l'effet négatif de la chromatine, ce qui est appelé l'anti-répression.

Pour que les facteurs de transcription accèdent à leur domaine de liaison sur l'ADN la structure de la chromatine doit être remodelée. Il existe certains complexes protéiques qui peuvent effectuer ce travail. Il s'agit des complexes SWI/SNF et NURF, tous deux ATP-dépendants (Orphanides *et al.*, 1996). Le complexe SWI/SNF chez la levure et un complexe homologue chez l'humain favorisent la liaison de l'activateur Gal4 et TBP à l'ADN (Côté *et al.*, 1994; Imbalzano *et al.*, 1994b). La structure de la chromatine remodelée reste à clarifier. Un mécanisme par lequel il est possible de renverser l'effet inhibiteur de la chromatine sur la transcription est l'acétylation des histones. En effet, il y a une corrélation entre le niveau d'acétylation

des histones et l'activité transcriptionnelle d'un domaine chromosomique (Wolffe et Pruss, 1996). Cette acétylation sur les résidus lysine de la queue N-terminale des histones peut neutraliser la charge positive de ces domaines et diminuer leur interaction avec l'ADN. Cela doit permettre l'association des facteurs de transcription, dont TBP, et ce, même en absence du complexe SWI/SNF (Wolffe et Pruss, 1996; Godde *et al.*, 1995; Imbalzano *et al.*, 1994b). Dernièrement, une activité acétyltransférase a été découverte chez certains facteurs de transcription tel que GCN5 chez la levure (Brownell *et al.*, 1996) et plus récemment chez TFIID via sa sous-unité hTAF<sub>II</sub>250 (Mizzen *et al.*, 1996). TFIID apparaît donc être impliqué dans un mécanisme d'anti-répression lui permettant d'accéder au promoteur. Une autre évidence appuyant cette hypothèse vient du fait que certains TAF<sub>II</sub>s dans TFIID adoptent une architecture semblable à celle de l'octamère d'histones, ce qui suggère que TFIID interagit avec le promoteur tel un nucléosome, enroulant l'ADN autour de lui-même et pouvant compétitionner avec le nucléosome pour la liaison à l'ADN (Oelgeschläger *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 1996; Nakatani *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996). L'assemblage de l'ARN pol II et de la majorité des FGTs, en absence des TAF<sub>II</sub>s, pourrait aussi comporter l'enroulement de l'ADN autour du complexe protéique. Cet enroulement nécessiterait TFIIE, TFIIIF et TFIIH et conférerait à ces facteurs un rôle dans l'anti-répression (Forget *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1998).

Certains répresseurs agissent de façon plus active que la chromatine pour réprimer la transcription de gènes spécifiques. Ces répresseurs sont séparés en deux classes, dépendamment de leur mécanisme d'action. Ainsi ils peuvent fonctionner soit par séquestration d'un activateur, effet nommé anti-activation, ou par interaction directe avec le PIC. La première classe de répresseurs comprend certaines protéines qui compétitionnent avec un activateur pour la liaison à l'ADN. Cette classe comprend également les répresseurs qui interagissent avec des activateurs, soit en solution ou liés au promoteur, pour bloquer leur domaine de liaison à l'ADN ou leur domaine d'activation. Le premier cas peut être représenté par la protéine CHOP qui forme un hétérodimère avec l'activateur C/EBP. Le complexe CHOP-C/EBP est incapable de lier l'ADN. Le deuxième cas est représenté par le système Gal4-Gal80 chez la levure. Gal4 active les gènes nécessaires au métabolisme du galactose.

Gal4 et Gal80 forment un complexe, et, en absence de galactose, ce dernier bloque le domaine activateur de Gal4. La deuxième classe de répresseurs comprend les répresseurs qui interagissent directement avec le PIC. Ceux-ci fonctionnent indépendamment de la présence d'un activateur et affectent la transcription basale. Par exemple, NC2/Dr1 est un répresseur agissant via une interaction avec TBP. Cette liaison empêche le recrutement des facteurs TFIIA, TFIIB et de l'ARN pol II au promoteur (Inostroza *et al.*, 1992; White *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1996). Dr2/DNA topo I agit de la même façon (Merino *et al.*, 1993). Le rôle de certains activateurs sera donc de contrecarrer l'effet négatif de ces répresseurs sur la transcription. Ainsi l'activateur E1a peut inverser l'effet d'inhibition causé par NC2/Dr1 *in vivo* et ce en le déplaçant de sa cible (Kraus *et al.*, 1994).

#### **Activation du recrutement des FGTs au promoteur.**

Tel que mentionné plus tôt, plusieurs interactions ont été décrites entre divers domaines d'activation et divers FGTs incluant les TAF<sub>II</sub>s. La première de ces interactions à être identifiée a été celle entre l'activateur VP16 et TBP (Stringer *et al.*, 1990). L'interaction est jugée importante du fait que des mutants de VP16 déficients en activation *in vivo* sont incapables de lier TBP *in vitro* (Ingles *et al.*, 1991). La fonction attribuée à ces interactions est de faciliter le recrutement du facteur ciblé au promoteur. Le recrutement facilité des FGTs au promoteur grâce à des activateurs représente encore le modèle le plus simple, et le plus généralement accepté, du mécanisme d'activation. Mais il n'est pas le seul. Une évidence appuyant fortement l'importance du recrutement de TBP au promoteur comme étape limitante de l'activation *in vivo* a été apportée simultanément par plusieurs équipes. Il a été montré que le recrutement de TBP de façon artificielle au promoteur suffisait à activer la transcription *in vivo* chez la levure (Chatterjee et Struhl, 1995; Xiao *et al.*, 1995; Klages et Strubin, 1995). D'autre part, lorsque les régions de TBP nécessaires à son interaction avec l'ADN sont mutées, son activité dans l'activation est inhibée sans affecter la transcription basale (Lee et Struhl, 1995; Kim *et al.*, 1994a).

L'effet de certains activateurs sur le recrutement de TFIID *in vitro* est bien documenté. Ainsi plusieurs études démontrent que divers activateurs agissent tôt dans la formation du PIC, soit dans l'assemblage de l'intermédiaire TFIID-TFIIA-ADN. Wang *et al.* (1992) ont démontré que l'assemblage d'un complexe TFIID-TFIIA-ADN est une étape limitante dans l'ouverture de l'hélice d'ADN stimulée par la protéine de fusion Gal4-AH. D'autres équipes ont par la suite montré que des activateurs et coactivateurs facilitent le recrutement de TFIID au promoteur, recrutement qui dépend de la présence d'un domaine activateur, des TAF<sub>II</sub>s et de TFIIA (Lieberman et Berk, 1994; Kobayashi *et al.*, 1995; Kaiser *et al.*, 1995; Shykind *et al.*, 1997). Il semble donc qu'un mécanisme privilégié par plusieurs activateurs soit la stimulation du recrutement du complexe TFIID/TFIIA au promoteur.

TFIIB est sans doute le FGT, avec TBP, pour lequel des interactions avec le plus grand nombre de domaines d'activation ont été décrites. Il a été démontré que certains de ces domaines d'activation, tel celui de Gal4-AH, favorisent le recrutement de TFIIB au PIC lorsque TBP y est déjà assemblé (Choy et Green, 1993; Lin et Green, 1991). Ces mêmes études suggèrent que le recrutement de TFIIB n'est pas une étape suffisante à l'activation, mais qu'une étape ultérieure impliquant les TAF<sub>II</sub>s est également ciblée (Choy et Green, 1993). Il est à noter que lors du dégagement du promoteur, TFIID demeure assemblé au promoteur et sert de pont d'attache pour l'assemblage de TFIIB, initiant ainsi un nouveau cycle de transcription (Zawel *et al.*, 1995). Il n'est donc pas fortuit d'observer autant d'activateurs régulant l'entrée de TFIIB car ils peuvent ainsi faciliter la réinitiation de la transcription.

### **Activation par changements de conformation.**

Le recrutement d'un FGT par un activateur n'est pas le seul mécanisme d'activation ayant été documenté. En effet l'activation peut impliquer certains changements conformationnels des FGTs, en plus d'agir sur d'autres étapes de la transcription. Les activateurs Gal4 et ATF altèrent la liaison de TFIID au promoteur provoquant des interactions en aval du promoteur tel qu'observé par protection à la DNase I

(Horikoshi *et al.*, 1988a, 1988b). L'effet est jugé significatif du fait que des dérivés de Gal4, inactifs en transcription *in vivo*, ne produisent aucun effet sur le patron de protection à la DNase I de TBP *in vitro*. Un changement qualitatif du complexe TFIID-TFIIA a aussi été observé en présence des activateurs Zta, du virus d'Epstein-Barr, et VP16 en présence du coactivateur HMG-2 (Lieberman et Berk, 1994; Shykind *et al.*, 1995), tous deux impliquant des interactions en aval de la boîte TATA. Récemment, il a été démontré que Zta stimule une isomérisation du complexe TFIID-TFIIA. Ce changement de conformation provoque la transition d'un complexe inactif en un complexe activé. L'hypothèse maintient que ce changement de conformation permettra le recrutement facilité des autres membres du PIC (Chi et Carey, 1996).

La liaison de TFIIIB au PIC induite par un activateur peut également impliquer un changement de conformation. Ce changement de conformation a été démontré pour VP16. Celui-ci peut perturber l'interaction intramoléculaire entre les parties N et C-terminales de TFIIIB, inhibant ainsi sa liaison au PIC (Roberts et Green, 1994).

### **Activation par modifications covalentes.**

D'autres modifications sont apportées aux FGTs lors de la transcription. Ce sont des modifications covalentes induites par des activités enzymatiques. Celles-ci peuvent être stimulées par des activateurs. La modification covalente la plus courante de la machinerie transcriptionnelle est la phosphorylation. Le domaine CTD de l'ARN pol II peut être modifié par phosphorylation. Cette phosphorylation déclenche le dégagement du promoteur. Le facteur TFIIH, via sa sous-unité cdk7/MO15, possède une activité kinase cycline-dépendante et spécifique au CTD. De plus, TFIIH interagit avec plusieurs activateurs dont l'activateur Tat du VIH, VP16 et p53 (Parada et Roeder, 1996; Xiao *et al.*, 1994). Dernièrement, il a été démontré que Tat stimule la phosphorylation du CTD par TFIIH et, par le fait même, stimule le passage d'une ARN pol II en phase d'initiation à une ARN pol II en phase d'élongation (Parada et Roeder, 1996).

Une activité phosphatase capable de déphosphoryler le CTD a été identifiée, offrant une cible possible de plus à des protéines régulatrices (Chambers et Dahmus, 1994). Ainsi la déphosphorylation du CTD, concomitante avec la terminaison de la transcription, ou lorsque l'ARN pol II est en solution, permettrait le retour à une ARN pol IIa capable de se réassocier au promoteur et permettre plus rapidement la réinitiation de la transcription (Dahmus, 1996).

Un autre facteur du PIC possédant une activité kinase est TAF<sub>II</sub>250 qui phosphoryle spécifiquement la sous-unité RAP74 de TFIIF. La fonction de cette phosphorylation n'est pas encore connue. Par contre, il est reconnu que l'activité de RAP74 lors de l'initiation et de l'élongation peut être régulée via cette modification (Kitajima *et al.*, 1994). Un activateur pourrait stimuler la phosphorylation de RAP74 qui permettrait à ce dernier de s'associer à l'ARN pol II dans un complexe d'élongation. Ainsi l'association de RAP74 à l'ARN pol II est plus efficace lorsque RAP74 est phosphorylé. Par ailleurs TFIIF est la cible d'au moins un activateur soit le facteur SRF (Joliot *et al.*, 1995). Il reste à savoir si SRF régule la phosphorylation de RAP74 par l'intermédiaire de TAF<sub>II</sub>250.

### **Activation au niveau de l'ouverture de l'hélice d'ADN et de l'élongation.**

Le mécanisme d'action des activateurs au niveau de ces deux étapes demeure énigmatique. L'activateur VP16 stimule la formation d'un complexe ouvert, possiblement en favorisant directement l'ouverture de l'hélice d'ADN (Wang *et al.*, 1992). Les facteurs TFIIIE, TFIIF et TFIIH sont impliqués dans l'ouverture de l'hélice d'ADN et dans le dégagement du promoteur. Leur fonction consiste à stabiliser l'ADN simple brin, phosphoryler le CTD et/ou permettre l'enroulement de l'ADN autour du PIC. Ces différentes étapes peuvent être régulées. Des interactions entre ces facteurs et des facteurs de régulation sont connues. TFIIF interagit avec SRF; TFIIIE interagit avec Krüppel, un facteur de régulation de la segmentation chez la drosophile (Sauer *et al.*, 1995a,b); et TFIIH interagit entre autres avec VP16, p53 et

Tat. Ces activateurs pourraient recruter TFIIF, TFII E et/ou TFII H au promoteur ou stimuler leurs activités respectives.

L'effet d'un activateur sur l'élongation est mesuré d'après sa capacité à rendre l'ARN pol II plus processive, c'est-à-dire qu'il permet à l'ARN pol II de passer outre des sites de pause ou d'arrêt rencontrés le long de la matrice d'ADN. Plusieurs facteurs de transcription stimulent la processivité de l'ARN pol II (Yankulov *et al.*, 1994). Certains d'entre eux, tels VP16 et E1a, stimulent à la fois l'initiation et l'élongation (Yankulov *et al.*, 1994). Le mécanisme par lequel un activateur rend l'ARN pol II plus processive n'est pas encore connu. Il a été proposé que les activateurs ciblant l'étape d'élongation le font via les facteurs TFIIF, TFII H et/ou l'ARN pol II (Bentley, 1995).

### **Activation et holoenzyme.**

À quel point le modèle de la formation du PIC via l'holoenzyme modifie-t-il notre vision de la régulation de la transcription? Tout d'abord, il introduit une nouvelle voie d'activation TAF<sub>II</sub>-indépendante. En effet l'holoenzyme de levure répond aux activateurs en absence des TAF<sub>II</sub>s et requière plutôt d'autres coactivateurs présents dans le médiateur (Koleske et Young, 1994; Kim *et al.*, 1994b). Le médiateur interagit directement avec l'activateur VP16 (Hengartner *et al.*, 1995). L'activateur tat interagit aussi avec une composante de l'holoenzyme humaine (Cujec *et al.*, 1997). Chez les mammifères, une holoenzyme a aussi été isolée ne contenant pas le facteur TFIID et capable de répondre à l'activateur VP16 *in vitro* (Maldonado *et al.*, 1996). Par contre des formes d'holoenzyme possédant TBP et des TAF<sub>II</sub>s ont été isolées chez le rat et l'humain (Ossipow *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1997). L'holoenzyme humaine répond aux activateurs VP16 et Sp1 (Pan *et al.*, 1997). Étant donné que la composition des holoenzymes jusqu'ici isolées dépend de la méthode de purification utilisée, il n'est pas clair quelle pourrait être la forme existante *in vivo*.

Le fait que le modèle d'assemblage du PIC par l'holoenzyme ne prévoit que deux étapes, soit l'association de TBP ou TFIID à la boîte TATA suivie du recrutement de l'holoenzyme, le nombre de sites de régulation est considérablement réduit. Dans un modèle séquentiel l'interaction d'un domaine activateur avec divers FGTs peut garantir une synergie d'activation en stimulant plus d'une étape de recrutement. Cependant, dans le modèle de l'holoenzyme, les différentes interactions activateur-FGTs deviennent redondantes. En effet, il a été montré qu'un contact entre une seule composante de l'holoenzyme, Gal11, et le domaine de liaison à l'ADN des protéines LexA, Gal4 ou Pho4 suffit à activer la transcription *in vivo* (Barberis *et al.*, 1995; Gaudreau *et al.*, 1997). Dans un cas, ce recrutement de l'holoenzyme permet également le remodelage de la chromatine (Gaudreau *et al.*, 1997). La plus simple interprétation de ce résultat est que l'activation est due au recrutement facilité de l'holoenzyme grâce à l'attachement de Gal11, composante de l'holoenzyme, sur une protéine liant l'ADN. Chacune des interactions activateur-FGT connues sont autant de surfaces d'interactions possibles entre l'holoenzyme et un activateur. Un mécanisme de synergisme pourrait être observé dans le cas où différents domaines activateurs agissent à la fois sur le recrutement de TBP ou TFIID et sur le recrutement de l'holoenzyme. Ceci a d'ailleurs été observé. La transcription est activée à un plus haut degré lorsque TFIID et TFIIB sont tous deux recrutés artificiellement à un promoteur plutôt qu'indépendamment (Gonzalez-Couto *et al.*, 1997). Un fait intéressant pertinent à l'activation via l'holoenzyme est de constater que celle-ci est associée au complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Wilson *et al.*, 1996). Ceci donne à l'holoenzyme la capacité intrinsèque de défaire l'ADN nucléosomal et permettre à ces différentes composantes d'accéder plus facilement au promoteur. Par contre, la nécessité du complexe SWI/SNF reste controversée car il a été observé qu'un remodelage de la chromatine est possible en son absence et par simple recrutement de l'holoenzyme (Gaudreau *et al.*, 1997). Il est donc possible que d'autres facteurs faisant partie de l'holoenzyme permettent le remodelage de la chromatine.

Des étapes de l'initiation de la transcription autres que le recrutement des FGTs au promoteur peuvent impliquer l'holoenzyme. L'ouverture de l'hélice, le dégagement du promoteur et l'élongation sont autant d'étapes pouvant être ciblées par des



activateurs. Ainsi TFIIF fait partie de l'holoenzyme et son activité kinase du CTD est régulé par certains activateurs. Par ailleurs l'efficacité d'élongation de l'ARN pol II est inhibée par des mutations dans les gènes SRB2 et SRB10, deux composantes de l'holoenzyme (Greenblatt, 1997). Il est intéressant de noter que le produit de SRB10 est une kinase cycline-dépendante qui phosphoryle le CTD. Le taux de phosphorylation du CTD est réduit lorsque SRB10 est muté (Liao *et al.*, 1995). Des activateurs pourraient donc agir sur celui-ci pour stimuler le dégagement du promoteur. Il est donc envisageable que, outre le recrutement des composantes du PIC sous forme d'holoenzyme, des activateurs assemblés sur des séquences régulatrices puissent également stimuler des étapes ultérieures de la transcription, permettant ainsi un effet de synergie. Ces activateurs pourraient agir sur diverses étapes tel que la restructuration de la chromatine, le recrutement de l'holoenzyme, l'enroulement de l'ADN, l'ouverture de l'hélice d'ADN, le dégagement du promoteur et l'élongation. L'effet de ces activateurs pourrait inclure des changements conformationnels ou des modifications covalentes tel que discuté ci-haut.

## **TFIIA.**

TFIIA a été l'un des premiers FGTs à être purifié et pourtant il demeure encore un des plus énigmatiques. TFIIA a été purifié de différentes sources tel que la levure, l'humain et le thymus de veau (Ranish et Hahn, 1991; Coulombe *et al.*, 1992; Samuels *et al.*, 1982). La composition du facteur varie selon l'espèce. Chez l'humain ce facteur est composé de trois sous-unités respectivement de  $M_r$  de 35, 19 et 12 kDa (Cortes *et al.*, 1992; Coulombe *et al.*, 1992). Chez la levure, il est composé de deux sous-unités de  $M_r$  de 32 et 13.5 kDa (Ranish et Hahn, 1991). Les gènes ont été clonés pour chacune des sous-unités chez la levure (Ranish *et al.*, 1992), la drosophile (Yokomori *et al.*, 1993; Yokomori *et al.*, 1994; Bernstein *et al.*, 1994) et l'humain (Ma *et al.*, 1993; Dejong et Roeder, 1993; Ozer *et al.*, 1994; Dejong *et al.*, 1995) et démontrent qu'elles sont hautement conservées à travers les espèces. D'ailleurs, yTFIIA est interchangeable avec hTFIIA dans un système de transcription *in vitro* de mammifère (Ranish *et al.*, 1992). Le clonage de la grosse sous-unité de 35 kDa chez l'humain et la drosophile (TFIIA $\alpha$ ) a démontré que le gène codait

également pour la sous-unité de 19 kDa (TFIIA $\beta$ ). Le précurseur (TFIIA $\alpha/\beta$ ) est clivé post-traductionnellement en ses deux sous-unités, la région N-terminale correspondant à la sous-unité  $\alpha$  et la région C-terminale à la sous-unité  $\beta$ . Le site de clivage n'est pas encore connu. La petite sous-unité (TFIIA $\gamma$ ) est codée par son propre gène.  $\gamma$ TFIIA est composée de deux sous-unités codées par des gènes différents: TOA1 et TOA2. TOA1 possède deux régions de forte homologie avec le gène  $\alpha\beta/L$  humain et de drosophile, soit les parties N et C-terminales. Plus particulièrement, la partie N-terminale de TOA1 est identique à 39% avec la sous-unité  $\alpha$  humaine tandis que la partie C-terminale de TOA1 est identique à 44% à la sous-unité  $\beta$  (Kang *et al.*, 1995; Yokomori *et al.*, 1993). TOA2 est similaire à 56% avec la sous-unité  $\gamma$  humaine (Ozer *et al.*, 1994) (figure 2).

La nécessité de TFIIA lors de l'initiation de la transcription a longtemps été un sujet de controverse. Des études antérieures tendaient à dire qu'il était soit indispensable, stimulateur ou pas nécessaire du tout, dépendant du système de transcription *in vitro* utilisé. Il est aujourd'hui généralement accepté que TFIIA stimule la transcription basale lorsque TFIID est utilisé mais n'a aucun effet en présence de TBP. Son rôle dans l'activation de la transcription est moins controversé. Il est généralement considéré essentiel à l'action de certains activateurs.

### **Rôle de TFIIA en transcription : anti-répression.**

Le fait que TFIIA agisse en stimulant la transcription en présence de TFIID, mais non de TBP, a forgé l'hypothèse que TFIIA contrecarre l'effet de facteurs associés à TBP qui empêchent sa liaison à la boîte TATA (Cortes *et al.*, 1992). En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que TFIIA peut relever l'effet d'inhibition causé par Dr2/DNA topo I dans un système de transcription *in vitro* (Merino *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1993). Un autre cofacteur négatif ayant une interaction directe avec TBP et ayant un effet inhibiteur sur la transcription est NC2/Dr1. Celui-ci et TFIIA interagissent tous deux avec la région basique de TBP (Kim *et al.*, 1995). TFIIA peut compétitionner avec NC2/Dr1 pour la liaison à TBP et ainsi relever son effet

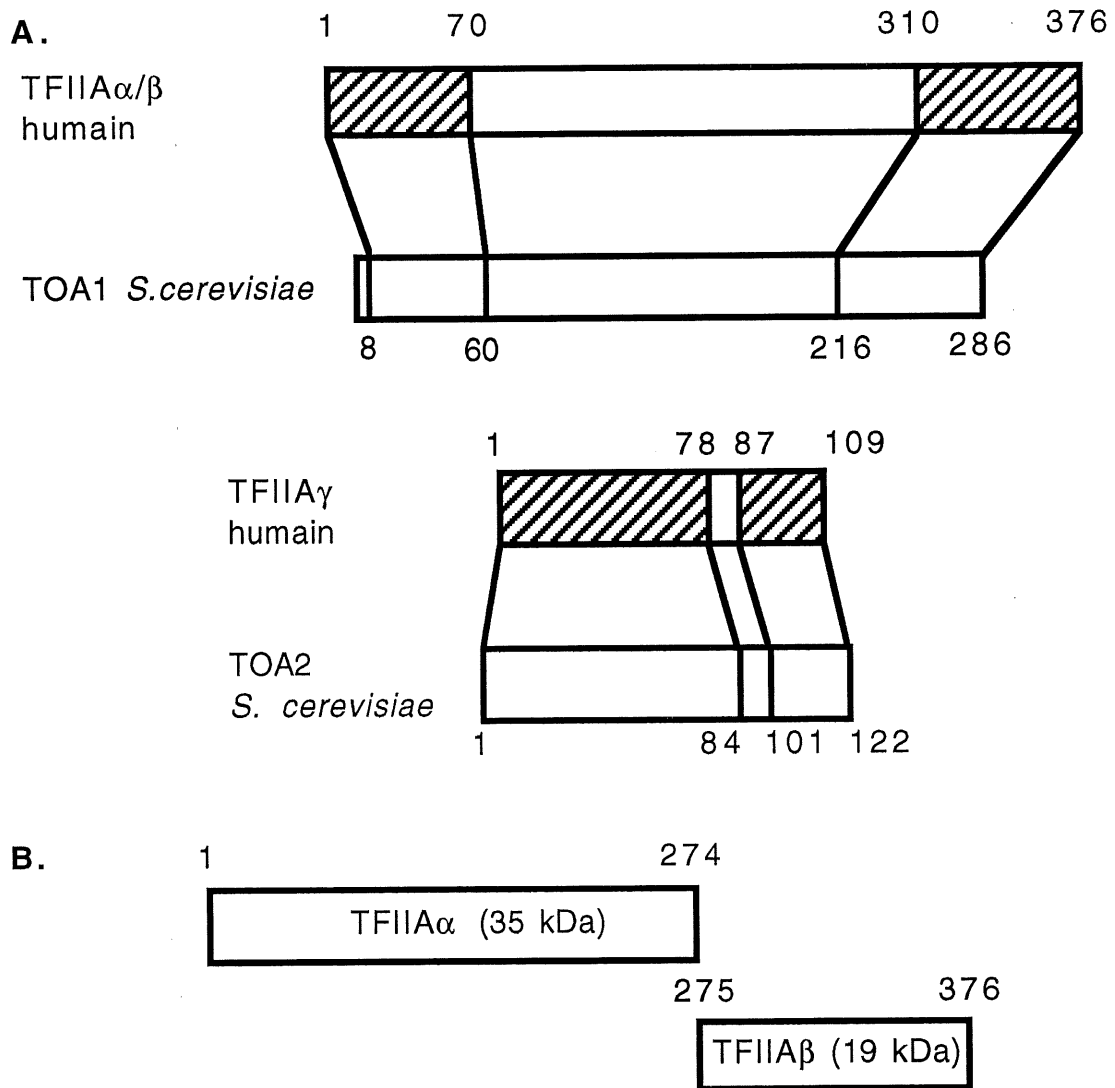


Figure 2.A) Représentation schématique des sous-unités de hTFIIA. Les régions hachurées sont les régions homologues entre hTFIIA et yTFIIA. B) Le précurseur TFIIA $\alpha/\beta$  chez l'humain est clivé post-traductionnellement en deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de 35 et 19 kDa respectivement. Le site de clivage au niveau de l'acide aminé 274/275 est approximatif.

inhibiteur (Kim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996). Il est aussi possible que TFIIA provoque un changement de conformation de TFIID empêchant son interaction avec des facteurs négatifs et vice versa. D'ailleurs une conformation "activée" du complexe TFIID-TFIIA-ADN est nécessaire pour obtenir l'activation par VP16. TFIIA peut aussi abolir l'effet inhibiteur de certains TAF<sub>II</sub>s. En effet, il a été démontré que TAF<sub>II</sub>170/Mot1 inhibe la liaison de TBP à certains promoteurs de manière ATP-dépendante (Poon *et al.*, 1994). TFIIA est en mesure de relever cette inhibition (Auble et Hahn, 1993; Auble *et al.*, 1994). Le rôle d'anti-répression de TFIIA peut aussi s'effectuer au niveau de la chromatine car des études de transcription *in vitro* reconstituée avec des nucléosomes montrent que TFIIA est nécessaire à la liaison du promoteur par TBP lors du remodelage de la chromatine (Imbalzano *et al.*, 1994b; Godde *et al.*, 1995). Cette nécessité proviendrait tout simplement de la capacité de TFIIA à stabiliser la liaison de TBP à la boîte TATA.

### **TFIIA et l'activation de la transcription.**

La nécessité du facteur TFIIA dans l'activation de la transcription par différentes classes d'activateurs *in vitro* et *in vivo* est généralement acceptée (Sun *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1993; Ozer *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1995; Dejong *et al.*, 1995). Étant donné qu'il n'est généralement pas requis pour la transcription basale, TFIIA peut être considéré comme un co-facteur similaire aux TAF<sub>II</sub>s. En accord avec ce rôle il interagit à la fois avec des activateurs tel VP16 et Zta (Kobayashi *et al.*, 1995), d'autres coactivateurs comme PC4 (Ge et Roeder, 1993) et TAF<sub>II</sub>110 (Yokomori *et al.*, 1994) et des FGTs tel TBP. Mais par quel mécanisme agit-il? *In vitro*, TFIIA est nécessaire pour médier la réponse des activateurs et ce même lorsqu'un système de transcription hautement purifié, dépourvu d'inhibiteurs, est utilisé (Ma *et al.*, 1996; Ozer *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1994). De plus, récemment, la fonction d'anti-répresseur de TFIIA a été séparée de celle de coactivateur (Ma *et al.*, 1996). Ainsi une forme de TFIIA ne contenant pas la sous-unité  $\alpha$ , baptisée mini-TFIIA, est capable de fonctionner comme anti-répresseur de Dr2/DNA topo I sans stimuler l'activation de la transcription par VP16. TFIIA doit donc permettre l'activation de la transcription par un autre mécanisme que celui de l'anti-répression. La possibilité

que l'un des TAF<sub>II</sub>s ait une fonction inhibitrice qui est contrecarrée par TFIIA n'a toutefois pas été écartée.

Une autre fonction de TFIIA est de stabiliser la liaison de TBP à la boîte TATA. Tel qu'énoncé plus tôt le simple recrutement artificiel de TBP au promoteur suffit à activer la transcription *in vivo* chez la levure. Il est donc censé de croire que tout mécanisme facilitant ce recrutement peut contribuer à l'activation. Par ailleurs, il a été démontré que l'interaction TBP-TFIIA est nécessaire à l'activation *in vivo*. En fusionnant la petite sous-unité de  $\gamma$ TFIIA, TOA2, à un mutant de TBP (N2-1) déficient pour l'activation et pour l'interaction avec TFIIA il a été possible de récupérer la fonction d'activation (Stargell et Struhl, 1995). Divers activateurs favorisent le recrutement d'un complexe TFIID-TFIIA. Par contre, le rôle stabilisateur de l'interaction TBP-boîte TATA par TFIIA ne semble pas être la seule manière pour activer la transcription. Ainsi, en absence de TAF<sub>II</sub>s l'activation n'est pas possible. De plus, une étape autre que le recrutement du complexe TBP-TFIIA a été mise en évidence comme étant nécessaire à l'activation *in vivo* (Stargell et Struhl, 1996). Ainsi, certains mutants de TBP déficients pour l'activation et capables d'interagir avec TFIIA ne peuvent pas être rescapés en les recrutant artificiellement au promoteur (Stargell et Struhl, 1996). TFIIA pourrait agir à une étape subséquente au recrutement de TFIID au promoteur. En appui à cette hypothèse, certains mutants de la sous-unité  $\gamma$  de hTFIIA ont été isolés. Ceux-ci stimulent la formation d'un complexe TBP-TFIIA-ADN mais ne peuvent pas médier l'activation de certains activateurs (Ozer *et al.*, 1996). Outre le recrutement de TFIID au promoteur, sur quelle étape TFIIA pourrait-il agir pour médier l'activation? Un changement de conformation du complexe TFIID-TFIIA-ADN doit s'opérer afin qu'il y ait activation. Peut-être ces mutants en sont-ils incapables. D'autre part des interactions de hTFIIA avec TFIIE et TFIIIF sont décrites dans ce mémoire et implique possiblement TFIIA dans l'enroulement de l'ADN autour de l'ARN pol II, de l'ouverture de l'hélice, et/ou de l'élongation. Le fait que TFIIA ne soit pas, jusqu'ici, retrouvé dans l'holoenzyme permet de croire que TFIIA, tout comme les TAF<sub>II</sub>s, est important pour l'activation d'un groupe de gènes seulement. Il est possible que TFIIA affecte la transcription des mêmes gènes impliquant les TAF<sub>II</sub>s mais non ceux impliquant les co-facteurs de l'holoenzyme. Le rôle de TFIIA n'est donc pas totalement compris.

## Structure du PIC.

La structure du PIC dépend de sa composition et des diverses interactions protéines-ADN et protéines-protéines de ses composantes. Cette structure détermine la fonction du PIC. De nombreuses études ont analysé la structure du PIC afin de mieux comprendre comment il fonctionne et comment il est régulé. Certains activateurs peuvent modifier la structure de certains facteurs en solution ou au niveau du promoteur. Il est donc important, pour comprendre comment un activateur agit sur le PIC, d'étudier la structure de ce dernier.

Les toutes premières études de la structure du PIC sur un promoteur utilisaient la méthode de protection à la DNase I (Buratowski *et al.*, 1989; Peterson *et al.*, 1990). C'est ainsi qu'il a été découvert que TBP lie une séquence spécifique: la boîte TATA (Davison *et al.*, 1983). Ces études établissaient des régions, le long d'un promoteur, occupées par les divers FGTs. Cependant, il n'était pas possible de distinguer entre la région occupée par un facteur en particulier et un effet de celui-ci sur la localisation d'un autre facteur présent sur le promoteur. Buratowski *et al.* (1989) ont construit un modèle linéaire dans lequel TFIID couvrait la boîte TATA, TFIIA était placé en amont de TFIID, TFIIB était situé en aval de TFIID, couvrant le site +1, et TFIIIE couvrait une région en aval du site +1 jusqu'à +30 tandis que l'ARN pol II couvrait une région allant de -47 à +20.

La structure de certains intermédiaires du PIC a été résolue par cristallographie. Ainsi, la structure des complexes TBP-ADN (Kim *et al.*, 1993a; Kim *et al.*, 1993b; Kim et Burley, 1994), TBP-TFIIB-ADN (Nikolov *et al.*, 1995) et TBP-TFIIA-ADN (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996), entre autres, a été analysée par cristallographie. Il est important de noter que la cristallographie de ces complexes a été produite avec des protéines tronquées. La possibilité que d'autres interactions ou changements de conformation, qui ne soient pas observés dans les cristaux, causés par des facteurs via leurs segments manquants, ne peut être exclue. La cristallographie de complexes plus gros étant difficile, il est nécessaire d'utiliser

d'autres méthodes de moindre résolution pour éclairer notre vision de la structure du PIC. Je décrirai ici quelques éléments structuraux du PIC tels que déterminés par diverses méthodes de haute et faible résolution.

La structure de la partie C-terminale conservée de TBP ("core TBP" ou cTBP) chez la levure, chez l'humain et chez *Arabidopsis thaliana* liés à l'ADN a été résolue par cristallographie. Ces études montrent que TBP lie le sillon mineur de l'ADN et a une forme de selle chevauchant l'ADN au niveau de la boîte TATA. La surface concave de TBP liant l'ADN est composée de dix brins antiparrallèles formant un feuillet  $\beta$  surmonté de quatre hélices  $\alpha$  sur la surface convexe. Ces dernières sont exposées à diverses interactions. Une caractéristique importante de la liaison de TBP à l'ADN est qu'il induit une forte courbure de l'ADN de  $80^\circ$  (Juo *et al.*, 1996).

La structure du complexe TBP-TFIIA-ADN a aussi été résolue par cristallographie (Tan *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 1996). Ce complexe comprend cyTBP et les régions conservées des deux sous-unités de  $\gamma$ TFIIA ("core  $\gamma$ TFIIA" ou cyTFIIA) associées à un fragment contenant la boîte TATA du promoteur CYC1. Il a été observé que TFIIA ressemble à un L. Les parties C-terminales de TOA1 et de TOA2 forment une structure en feuillets  $\beta$ : le baril  $\beta$ . Dans cette structure, 3 feuillets antiparrallèles de chaque polypeptide s'encerclent partiellement l'un dans l'autre. Les parties N-terminales de TOA1 et TOA2 forment un amas composé de 4 hélices  $\alpha$  formant ainsi l'autre bras du L. Le baril  $\beta$  débute à la boîte TATA rejoignant l'amas d'hélices  $\alpha$  plus en amont. Ce dernier s'étend perpendiculairement à l'hélice d'ADN. Le baril  $\beta$  est responsable des interactions avec TBP et l'ADN. Les interactions entre TBP et TFIIA se font surtout entre le feuillet  $\beta$  de TOA2 et un brin  $\beta$  au niveau du "stirrup" N-terminal de TBP. Le domaine basique de TBP pourrait également être impliqué dans la liaison à TFIIA (Buratowski et Zhou, 1992; Lee *et al.*, 1992; Stargell et Struhl, 1995). La cristallographie a aussi permis d'observer des contacts entre la partie C-terminale de TOA1 et l'ADN au niveau de la boîte TATA et avec des bases situées 5 paires de nucléotides en amont de la boîte TATA. L'amas d'hélices  $\alpha$  forme une surface facilement accessible à différents facteurs impliqués dans la transcription.

Suite à la reconnaissance du promoteur par TBP, TFIIB peut s'assembler sur un complexe TBP-ADN ou TBP-TFIIA-ADN via des interactions avec TBP pour former le complexe TBP-TFIIB-ADN ou TBP-TFIIA-TFIIB-ADN respectivement (Buratowski *et al.*, 1989). Le complexe TBP-TFIIB-ADN a été analysé par diverses méthodes dont le "photocross-linking" et tout récemment par cristallographie (Lagrange *et al.*, 1996; Nikolov *et al.*, 1995). Ces études s'accordent pour dire que TFIIB se fixe sous la surface concave de TBP en faisant contact avec l'ADN de part et d'autre de la boîte TATA. La cristallographie du complexe TBP-TFIIB-ADN montre que TFIIB interagit avec le "stirrup" C-terminal de TBP.

Le PIC comprend plus de 34 polypeptides et atteint un  $M_r$  de 2 MDa. Ce complexe étant trop gros pour être résolu par cristallographie, des méthodes de moindre résolution doivent être utilisées pour nous renseigner sur sa structure. Coulombe *et al.* (1994) ont localisé certains facteurs du PIC le long du promoteur Ad2ML en utilisant la méthode de  $N_3R$ -dUMP-photocross-linking. Cette méthode permet de sonder la topologie d'intermédiaires du PIC plus complets et d'utiliser des protéines tronquées ou complètes. TFIIA étend la région protégée de la digestion à la DNase I par TBP en amont du promoteur Ad2ML de -38 à -42 (Coulombe *et al.*, 1994; Buratowski *et al.*, 1989). Coulombe *et al.* (1994) ont utilisé la méthode de  $N_3R$ -dUMP-photocross-linking pour localiser les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de hTFIIA justement dans cette région du promoteur. Il a aussi été possible de localiser TBP, TFIIB et RAP30 ainsi qu'une sous-unité de l'ARN pol II le long du promoteur Ad2ML dans le contexte d'un complexe comprenant TBP, TFIIB, TFIIF et l'ARN pol II. Ces polypeptides ont été pontés en aval de la boîte TATA à la position -19. A ce complexe sera ajouté TFIIIE et sa sous-unité TFIIIE34 sera localisée juste en amont du site +1 tandis que RAP74 sera pontée sur l'autre face de l'ADN, également en amont du site +1, en accord avec un rôle dans l'ouverture de l'hélice d'ADN (Robert *et al.*, 1996). De nouvelles données de "photocross-linking" et de microscopie électronique révèlent que l'ADN du promoteur s'enroule autour du PIC (Forget *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1998). En effet, TFIIF (RAP30 et RAP74), TFIIIE34 et des sous-unités de l'ARN pol II sont pontées à la fois en amont et en aval de la boîte TATA suggérant un rapprochement des fragments d'ADN flanquant la boîte TATA. De plus, une cinquantaine de paires de bases sont enfouies dans le



PIC, tel qu'observé par microscopie électronique, suggérant par surcroît l'enroulement de l'ADN autour du PIC. TFIIE, TFIIIF et TFIIH pourraient être impliqués dans l'enroulement de l'ADN autour de l'ARN pol II, provoquant un changement de conformation du PIC. Il sera donc intéressant d'étudier l'effet d'un activateur lié au promoteur sur la structure du PIC, en particulier sur l'enroulement de l'ADN.

### **Objectifs.**

Dans cette étude, nous allons sonder par N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking la composition et la structure du complexe ternaire TBP-TFIIA-ADN. TBP ainsi que les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de hTFIIA ont déjà été localisées à certaines positions le long du promoteur Ad2ML (Coulombe *et al.*, 1994). Nous examinerons plusieurs autres positions le long de ce promoteur pour mieux définir la situation des polypeptides déjà identifiés et pour localiser la sous-unité  $\gamma$  de TFIIA. Tel que discuté auparavant, la méthode de N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking nous permet d'étudier la composition des différents complexes ainsi que la position relative de chaque polypeptide le long du promoteur. Elle nous permet également d'identifier des changements de conformation causés par l'association d'un facteur au complexe transcriptionnel.

Forget *et al.* (1997) a montré que RAP74 et la sous-unité de 145 kDa de l'ARN pol II sont pontées entre les régions -39 et -48, région où TFIIA a déjà été ponté suggérant qu'il peut y avoir une interaction entre ces protéines. Nous analyserons les interactions entre TFIIA et les autres FGTs et l'ARN pol II par chromatographie d'affinité.

Nous avons vu l'importance de l'intermédiaire TFIID-TFIIA lors de la formation du complexe de pré-initiation de la transcription. Cet intermédiaire est une cible privilégiée de divers activateurs. L'étude de la structure du complexe TBP-TFIIA-

ADN peut nous aider à mieux comprendre le mécanisme d'action des activateurs agissant à ce niveau.

TFIIA est nécessaire pour médier l'activation de la transcription mettant en jeu divers activateurs. L'analyse des interactions de TFIIA avec les autres membres du PIC peut nous renseigner sur l'étape de la transcription impliquant TFIIA et sur laquelle agissent certains activateurs.

## CHAPITRE 1

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 1.1. Facteurs de transcription.

Les protéines yTBP (Ingles *et al.*, 1991) et hTFIIB (Ha *et al.*, 1991) ont été préparées tel que décrit précédemment. hTFIIA ainsi que bTFIIA ont été partiellement purifiés par chromatographie d'affinité sur une colonne de TBP tel que décrit précédemment (Coulombe *et al.*, 1992). Brièvement, un extrait cellulaire complet a été préparé à partir de 30 g de cellules Hela ou de thymus de veau et chromatographié sur une colonne de 1 ml contenant 5 mg yTBP/ml affigel 10 (Bio-Rad Laboratories). La colonne a été lavée avec 10 volumes de tampon de lavage (10mM HEPES, pH 7.9, 0.2mM EDTA, 10% glycérol et 1mM DTT) contenant 0.1M NaCl, puis éluée avec des aliquots de 500 ul du même tampon contenant 0.5M NaCl. Les éluats ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'une coloration au nitrate d'argent.

#### 1.2. N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking.

La préparation des sondes et les conditions pour la formation des complexes sont telles que décrites précédemment (Coulombe *et al.*, 1994). Une représentation schématique des diverses sondes photosensibles utilisées apparaît à la figure 3. Pour chaque sonde la concentration de poly(dG:dC) dans la réaction de liaison est optimisée pour favoriser une liaison spécifique et se situe entre 0.1 et 1.0 ug par réaction. Généralement, les réactions contenaient entre 100 à 200 ng de yTBP, 1 à 10 ng de hTFIIA ou bTFIIA et/ou 100-200 ng de hTFIIB. Les conditions d'irradiation aux UV, le traitement aux nucléases et l'analyse par SDS-PAGE des produits radioactifs de pontage sont telles que décrites précédemment (Coulombe *et al.*, 1994).

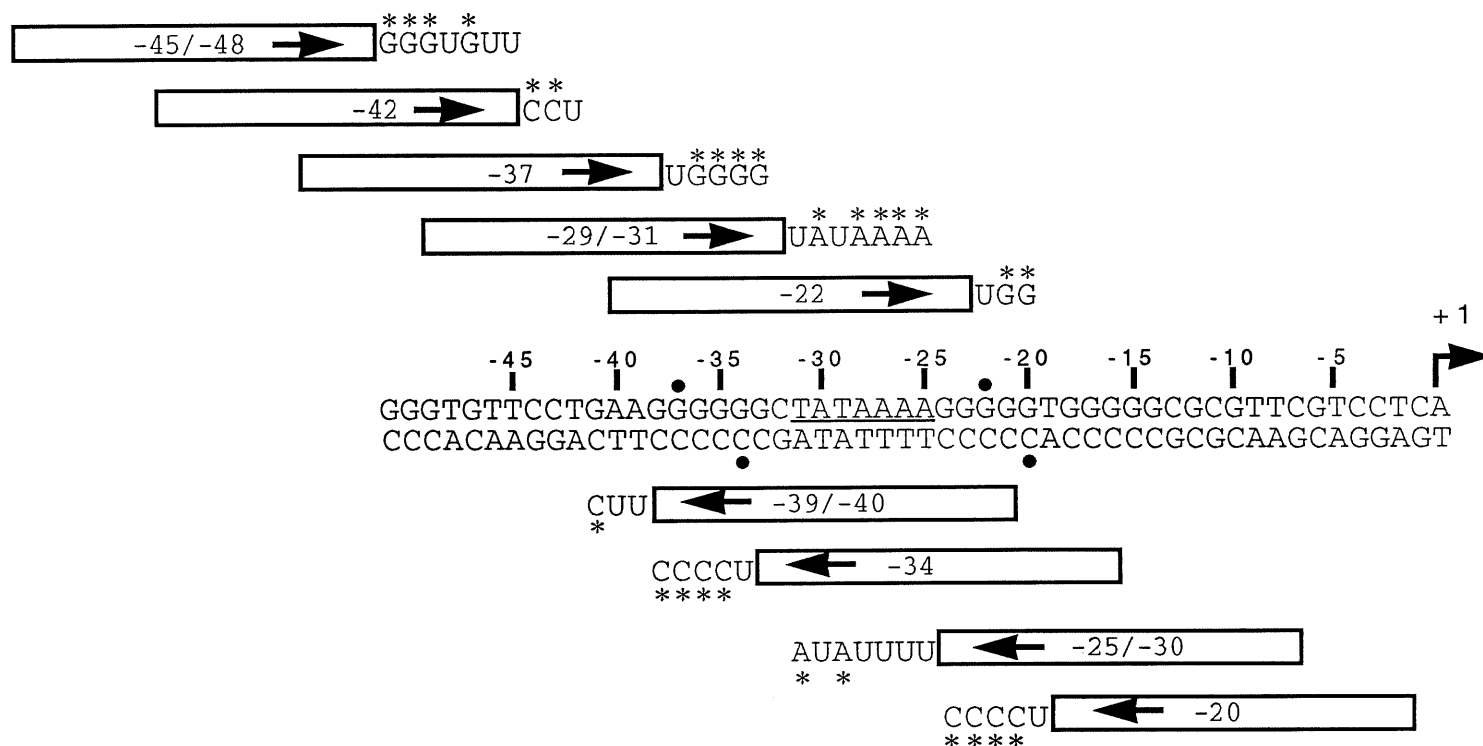


Figure 3. Sondes photoréactives dérivées du promoteur Ad2ML. L'élément TATA est souligné sur le brin codant et le site d'initiation de la transcription (+1) est indiqué par une flèche. Les mutations utilisées dans certaines de nos sondes sont indiquées par des points (●). Les oligonucléotides servant à fabriquer les sondes sont représentées par des boîtes qui sont identifiées par la position à laquelle un nucléotide photoréactif N<sub>3</sub>R-dUMP (U) a été introduit. La flèche dans chaque boîte indique la direction de synthèse de la sonde. Dans chaque cas les positions des nucléotides radioactifs sont identifiées par un astérisque (\*).

### 1.3. Interactions protéine-protéine.

Les interactions protéine-protéine ont été analysées par chromatographie d'affinité selon la méthode décrite précédemment (Coulombe *et al.*, 1992). Les facteurs TBP, TFIIB, RAP30 et TFIIE34 ont été immobilisées sur de l'affigel 10 à une concentration d'approximativement 1 mg de protéine/ml de résine. Les colonnes de TFIIE56, RAP74 et d'ARN pol II contenaient 2, 3 et 4.5 mg de protéine/ml de résine respectivement. Un volume de 50  $\mu$ l de hTFIIA (approximativement 100 ng de la sous-unité  $\alpha$ ) a été chromatographié sur des colonnes de 25  $\mu$ l contenant une protéine immobilisée. La fraction de passage a été recueillie. Ensuite chaque colonne est éluée successivement avec deux volumes de colonne du tampon de liaison (10mM HEPES, pH 7.9, 0.2mM EDTA, 10% glycérol et 1mM DTT) contenant 0.1M, 0.3M et 0.5M NaCl. La fraction de passage et les fractions d'élution sont analysées par SDS-PAGE puis visualisées par coloration au nitrate d'argent. La liaison de TFIIA à la colonne est contrôlée en quantifiant la sous-unité  $\alpha$  dans chaque fraction. Un polypeptide contaminant de la fraction de TFIIA a été utilisé comme contrôle négatif dans chaque cas. La densitométrie a été pratiquée avec un densitomètre GS-670 (Bio-Rad Laboratories). L'expérience de chromatographie d'affinité apparaissant à la figure 9 a été réalisée de manière identique aux autres décrites ci-haut omis quelques détails. Quatre colonnes ont été préparées contenant respectivement 0.8, 1.6, 3.2 et 6.4 mg de RAP74/ml d'affigel 10. La colonne sans RAP74 contenait de l'albumine sérique de bovin (BSA). La fraction de passage a été chromatographiée 3 fois sur chaque colonne de RAP74. Les colonnes ont ensuite été lavées avec 10 volumes de colonne du tampon de liaison contenant 0.1M NaCl puis ont été éluées avec deux volumes de colonne du tampon de liaison contenant 0.5M NaCl. Ces dernières fractions ont été analysées par SDS-PAGE suivi d'une coloration au nitrate d'argent.

#### 1.4. Gel de retardement de bande.

Des essais de retardement de bande ont été effectués pour vérifier l'activité de hTFIIA partiellement purifié et de hTFIIBr. Les sondes utilisées contenaient le promoteur Ad2ML (-50 à +33) avec l'élément TATA sauvage ou une variante mutante (TAGAGAA au lieu de TATAAAA). Approximativement 1 ug du plasmide a été digéré par l'enzyme de restriction BamH1 (20U) (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) dans le tampon OnePhorAll 2X durant 1 heure à 37°C, puis marqué par remplissage de l'extrémité 3'. Le marquage s'est fait, sans changement de tampon, avec 10 uCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dGTP, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP et l'enzyme Klenow (2U) pendant 1 heure à 37°C. La réaction de marquage a été soumise à un électrophorèse dans un gel d'acrylamide de 8%. La bande a été localisée par autoradiographie, extraite, puis l'ADN a été élué en incubant dans 200 ul d'eau pour la nuit. Les conditions pour la réaction de liaison étaient telles que décrites précédemment (Coulombe *et al.*, 1994). Une réaction typique contenait 10% glycérol, 20 mM HEPES pH 7.9, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 100 ug/ml BSA, 16 mM sulfate d'ammonium, 100 mM KCl/NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 ug poly(dG:dC), 50-100 ng de yTBPr, 1-10 ng de hTFIIA naturel, 100-200 ng hTFIIBr et 10 000 cpm de la sonde. Les protéines et la sonde ont été incubées ensemble 30 minutes à 30°C, puis les réactions ont été migrées dans un gel de 4% polyacrylamide dans des conditions non-dénaturantes telles que décrit précédemment (Flores *et al.*, 1991). À la fin de la migration le gel a été séché. Les retardements de bande ont été révélés par autoradiographie avec un film Kodak XAR-5 et des écrans intensificateurs.

#### 1.5. Transcription *in vitro*.

Des essais de transcription *in vitro* ont été réalisés pour vérifier l'activité de yTBP lors de sa purification. Un extrait nucléaire préparé à partir de cellules Hela a été traité 20 minutes à 47°C pour inactiver toute l'activité TBP endogène tel que décrit précédemment (Coulombe *et al.*, 1992). Cet extrait nucléaire inactivé est ensuite

incubé une heure à 30°C en présence de yTBPr, de la matrice d'ADN et des 4 NTPs. La matrice d'ADN est le plasmide pML(C<sub>2</sub>AT) $\Delta$ -50, qui possède le promoteur Ad2ML en amont d'une cassette sans nucléotide G, linéarisé avec l'enzyme de restriction *EcoR1* (20U) (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.). Chaque réaction contenait typiquement 1 ug d'ADN, 12.5 uCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP, 0.75 mM ATP, 0.75 mM CTP, 8U Rnasine (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM HEPES pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 3 mM EGTA, 6% glycérol et 30 mM KCl. La réaction est arrêtée avec 200 ul d'une solution d'arrêt (0.1 mg/ml ARNt, 100 mM sodium acetate, 0.5% SDS). L'ARN est ensuite isolé par extraction au phénol acide, suivie d'une extraction au chloroforme puis d'une précipitation à l'éthanol. L'ARN est resuspendu dans 20 ul de tampon formamide (80% formamide, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 mg/ml xylène cyanol FF, 1 mg/ml bleu de bromophénol), bouilli 5 minutes puis migré dans un gel d'acrylamide 4%. L'ARN marqué radioactivement est analysé par autoradiographie avec un film Kodak XAR-5 et des écrans intensificateurs.

## CHAPITRE 2

### RÉSULTATS

#### 2.1. Pontage des sous-unités de hTFIIA.

Une étude antérieure de la localisation de TFIIA sur un promoteur de type II par N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking avait permis de localiser deux sous-unités de hTFIIA, soit TFIIA $\alpha$  et TFIIA $\beta$ , ainsi que  $\gamma$ TBP sur le promoteur Ad2ML (Coulombe *et al.*, 1994). Par contre la position de la sous-unité  $\gamma$  de hTFIIA n'a pas été déterminée. Afin de localiser cette sous-unité et afin d'avoir une meilleure vue de l'arrangement spatial du complexe TBP-TFIIA-ADN, nous avons poursuivi ces études de N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking sur de nouvelles positions le long du promoteur Ad2ML. Nous avons muté quatre positions le long du promoteur Ad2ML, remplaçant la base normale par une thymine, pour former quatre nouvelles sondes photoréactives. L'ensemble des sondes permet de placer le nucléotide photoréactif N<sub>3</sub>R-dUMP à chaque cinq nucléotides sur chaque brin allant de -48 à -19, permettant ainsi de scruter chaque face de l'hélice d'ADN (figure 3). Les complexes dont nous avons analysé la topologie comprennent  $\gamma$ TBP $\alpha$  et hTFIIA partiellement purifié à partir de cellules Hela assemblés sur le promoteur Ad2ML. Les résultats de pontage sont compilés à la figure 4.

Pour ce qui est de TFIIA, aucune de ses sous-unités n'est pontée aux positions testées en aval de la boîte TATA. Au niveau de la boîte TATA, TFIIA $\beta$  est fortement ponté aux positions -29/-31 tel que décrit précédemment par Coulombe *et al.* (1994). TFIIA $\beta$  est aussi ponté faiblement aux positions -37 et -42. Il est fortement ponté comparativement aux autres polypeptides aux positions -34 et -39/-40. Notons que TFIIA $\beta$  est ponté plus faiblement à la position -42 et n'est pas pontée aux positions -45/-48. TFIIA $\alpha$  quant à lui n'apparaît qu'à une dizaine de nucléotides en amont de la boîte TATA soit aux positions -39/-40 tel que décrit précédemment (Coulombe *et al.*, 1994). TFIIA $\alpha$  est aussi ponté aux positions -42 et -45/-48. TFIIA $\gamma$  n'a été ponté à



aucune des positions testées. Nous observons le pontage de TBP à chacune des positions examinées quoiqu'à des intensités relatives différentes. TBP est à peine perceptible aux positions -22 et -20. Il est fortement ponté sur une des faces de l'ADN au niveau de la boîte TATA soit aux positions -25/-30 mais très faiblement sur l'autre face aux positions -29/-31.

L'identité des polypeptides pontés a été déduite d'après leur  $M_r$ . La spécificité des pontages des différents polypeptides est vérifiée en effectuant les expériences de  $N_3R$ -dUMP-photocross-linking en absence de TBP. Étant donné que TFIIA ne lie pas l'ADN en absence de TBP le pontage de ses sous-unités dépend toujours de sa présence.



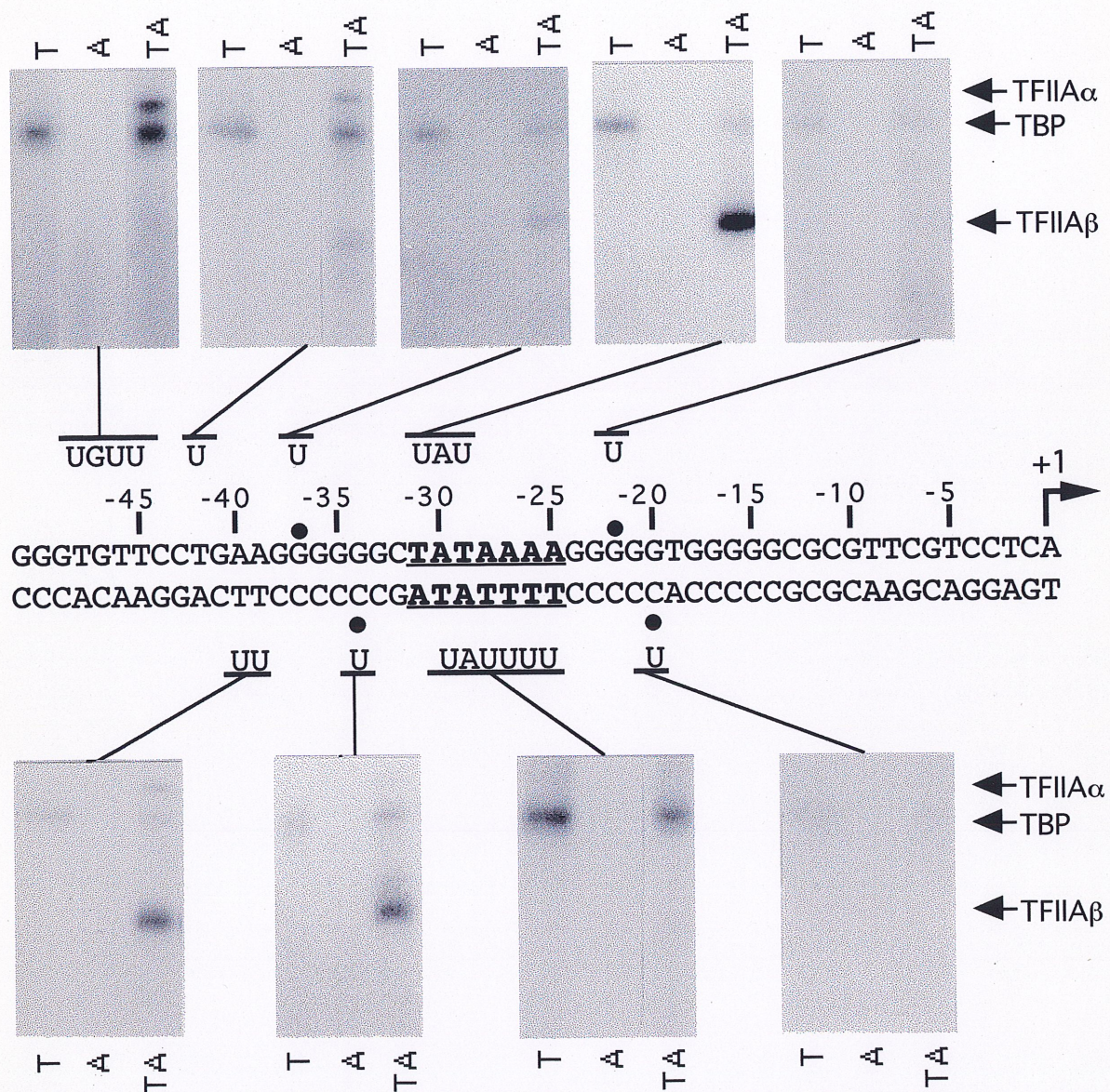


Figure 4. Pontage de yTBP et de hTFIIA sur le promoteur Ad2ML. Les positions où les nucléotides photosensibles (U) ont été insérés sont indiquées pour chaque sonde. Pour chaque position, les expériences de pontage contenaient soit TBP seul (T), TFIIA seul (A) ou TBP et TFIIA (TA). Le symbole (●) indique les positions où un G ou un C a été remplacé par un T par mutagenèse dirigée dans la séquence du promoteur. La boîte TATA est soulignée. Le site +1 de la transcription est indiqué par une flèche. Les bandes correspondant à TBP, TFIIA $\alpha$  et TFIIA $\beta$  sont montrées par des flèches.



Dans certains cas, la spécificité des pontages a aussi été évaluée en utilisant une sonde dont la boîte TATA avait été mutée de TATAAAA à TAGAGAA. La figure 5 montre un exemple avec la sonde plaçant le nucléotide photoréactif à la position -42. Nous nous assurons ainsi que l'assemblage du complexe analysé est spécifique à la liaison TBP-boîte TATA. L'utilisation d'une sonde de type sauvage en présence de TBP permet d'observer un pontage de TBP et des sous-unités TFIIA $\alpha$  et  $\beta$  pour hTFIIA. L'utilisation de sondes mutées a le même effet que le pontage en absence de TBP, soit l'abolition des signaux de pontage.



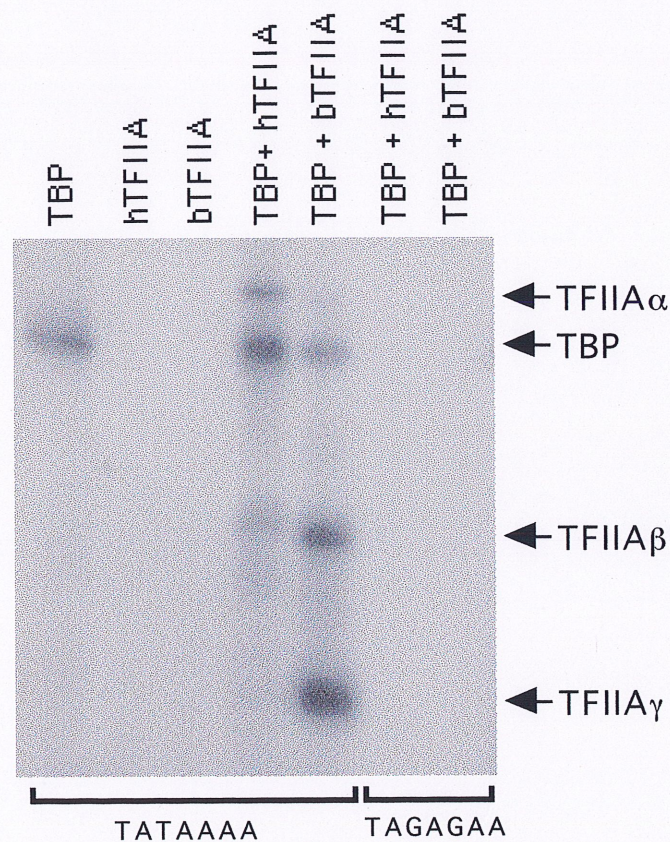


Figure 5. Spécificité du pontage de hTFIIA et de bTFIIA à la position -42 sur le promoteur Ad2ML. Des pontages ont été effectués en utilisant deux sondes qui placent un nucléotide photosensible à la position -42. Une sonde contenait une boîte TATA de type sauvage (TATAAAA) et l'autre mutante (TAGAGAA). Les pontages contenaient soit TBP seul, TFIIA seul ou TBP et TFIIA. Les positions de TBP et des sous-unités de TFIIA sont indiquées par des flèches.



## 2.2. Pontage des sous-unités de bTFIIA.

bTFIIA a été décrit comme étant composé de deux sous-unités de 19 et 12 kDa c'est-à-dire de même  $M_r$  que les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  chez l'humain, mais dépourvu de la sous-unité  $\alpha$  de 35 kDa (Coulombe *et al.*, 1992). Étant donné que le TFIIA bovin purifié ne contient pas TFIIA $\alpha$ , nous avons posé l'hypothèse que TFIIA $\gamma$  pourrait être plus accessible au nucléotide photoréactif. Dans le but de situer TFIIA $\gamma$  le long du promoteur Ad2ML, des expériences de  $N_3R$ -dUMP-photocross-linking furent effectuées en présence de  $\gamma$ TBPr et bTFIIA partiellement purifié. Un sous-ensemble des sondes utilisées pour positionner les sous-unités de hTFIIA ont été utilisées (voir section précédente). Les résultats de ces expériences apparaissent à la figure 6.

En aval et au niveau de la boîte TATA, les résultats des pontages ne diffèrent pas de ceux obtenus avec hTFIIA. Aux positions -39/-40 le long du promoteur nous observons le pontage de TBP et de TFIIA $\beta$  en ordre d'intensité croissante. Nous observons également le pontage de deux autres polypeptides dont le  $M_r$  correspond à 35 et à 12 kDa. Puisque le polypeptide de  $M_r \sim 12$  kDa (i) correspond au  $M_r$  prévu pour TFIIA $\gamma$ , (ii) lie une colonne de TBP et (iii) fait contact avec l'ADN uniquement en présence de TBP, nous proposons qu'il s'agit de TFIIA $\gamma$ . Aux positions -39/-40, le pontage de TFIIA $\beta$  est le plus important, ceux de TBP et TFIIA $\gamma$  sont d'égale intensité tandis que le pontage de TFIIA $\alpha$  est plus faible. À la position -42, les mêmes polypeptides sont pontés, mais les bandes correspondant à TBP, TFIIA $\beta$  et TFIIA $\gamma$  semblent d'égale intensité tandis que celle correspondant à TFIIA $\alpha$  apparaît encore très faiblement. En s'éloignant encore plus de la boîte TATA, aux positions -45/-48, TBP, TFIIA $\beta$  et TFIIA $\gamma$  sont pontés également mais TFIIA $\alpha$  n'est plus visible. La spécificité du pontage des sous-unités de bTFIIA a été établie de la même façon que précédemment soit en absence de TBP et en utilisant certaines sondes dont la boîte TATA avait été rendue inactive par mutation (figure 5).



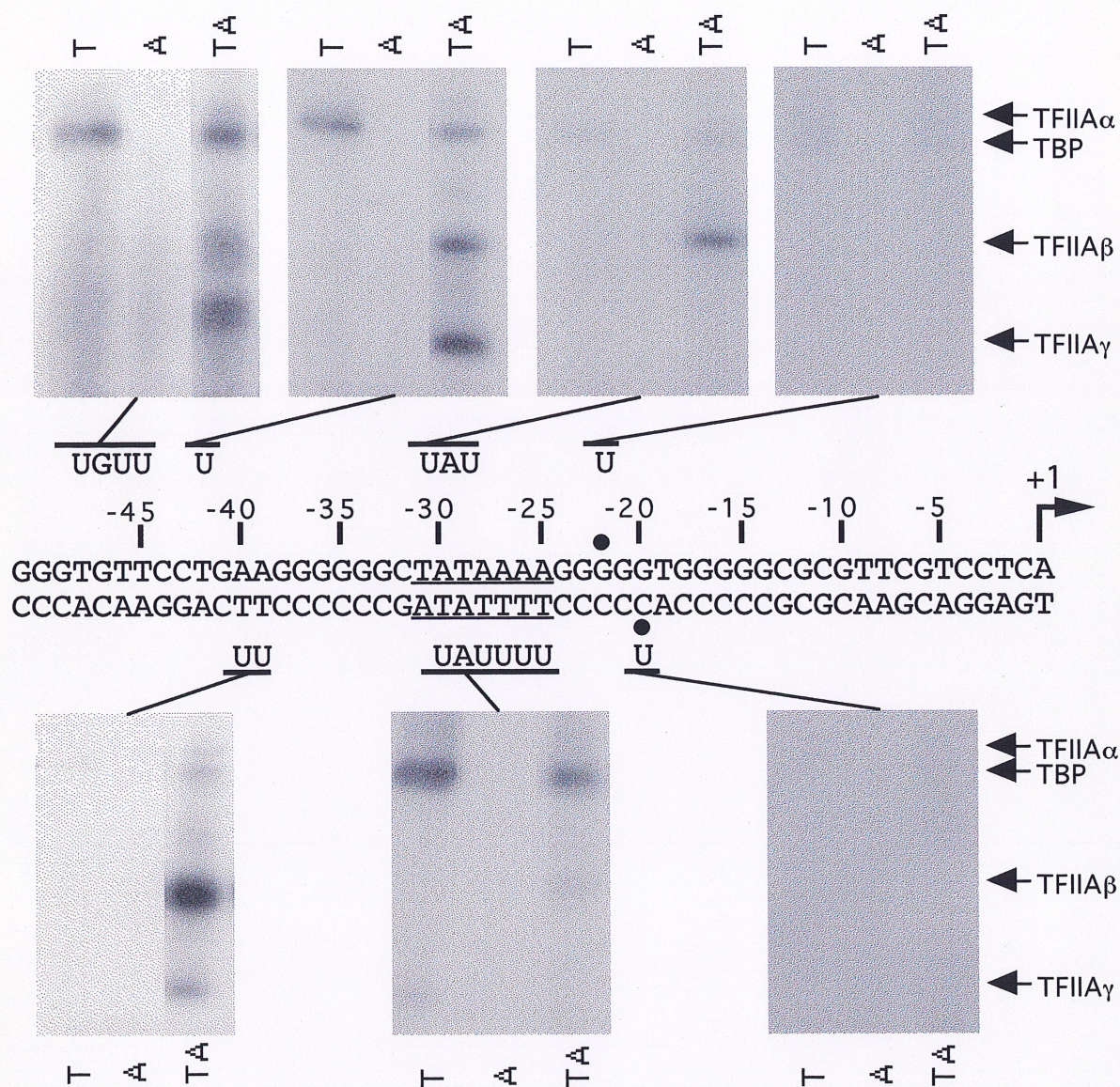


Figure 6. Pontage de  $\gamma$ TBP et de bTFIIA sur le promoteur Ad2ML. Les positions où les nucléotides photosensibles (U) ont été insérés sont indiquées pour chaque sonde. Pour chaque position, les expériences contenaient soit TBP seul (T), TFIIA seul (A) ou TBP et TFIIA (TA). Le symbole (●) indique les positions où un G ou un C a été remplacé par un T par mutagenèse dirigée dans la séquence du promoteur. La boîte TATA est soulignée. Le site +1 de la transcription est indiqué par une flèche. Les bandes correspondant à TBP, TFIIA $\alpha$ , TFIIA $\beta$  et TFIIA $\gamma$  sont montrées par des flèches.



Des doutes persistent quant à la véritable identité des polypeptides pontés chez bTFIIA. L'identité de TFIIA $\alpha$  reste énigmatique, puisqu'un polypeptide de ce  $M_r$  semble toujours absent ou présent à des concentrations nettement sous-stoechiométriques des préparations de bTFIIA. Il subsiste aussi l'hypothèse que TFIIA $\gamma$  et/ou TFIIA $\beta$  soient des produits de dégradation de TFIIA $\alpha$ . Nous avons donc examiner la possibilité d'une protéolyse de TFIIA $\alpha$  dans notre échantillon de bTFIIA. Un échantillon de bTFIIA a été incubé à 37°C pour différentes durées avant de l'utiliser dans des expériences de N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking à la position -42 (figure 7). Le pontage de TFIIA $\alpha$  diminue progressivement jusqu'à être imperceptible après 40 minutes d'exposition à la chaleur. Par ailleurs, les bandes correspondant à TFIIA $\beta$  et TFIIA $\gamma$  n'augmentent pas d'intensité. A partir de ces résultats, nous suggérons que TFIIA $\alpha$  est dégradé lors de la préparation de bTFIIA par une activité protéolytique qui est absente ou nettement réduite dans les cellules Hela.



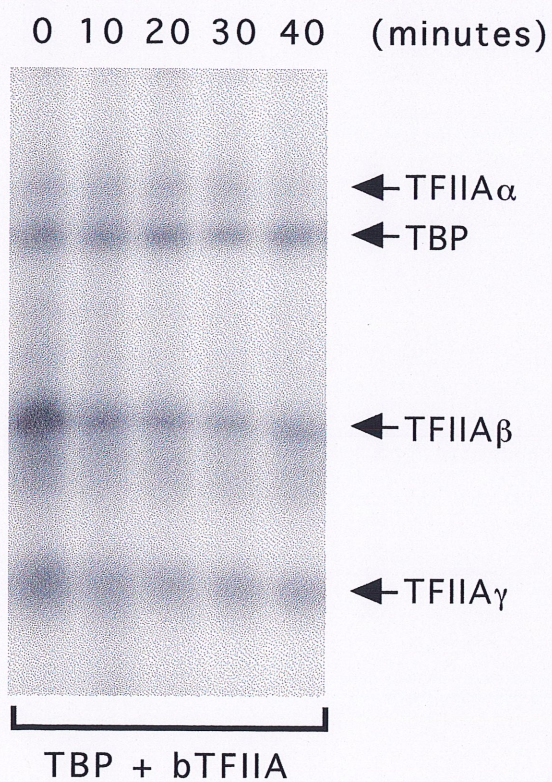


Figure 7. Disparition du pontage de la sous-unité  $\alpha$  de bTFIIA à la position -42 du promoteur Ad2ML par exposition de TFIIA à la chaleur. L'échantillon de bTFIIA a été incubé à 37°C pour différentes durées entre 0 et 40 minutes avant d'être utilisé dans les expériences de  $N_3R$ -dUMP-photocross-linking. Les positions de TBP et des sous-unités de TFIIA sont indiquées par des flèches.



### 2.3. Interactions de TFIIA avec les facteurs généraux de transcription.

Nos résultats indiquent que TFIIA fait contact avec l'ADN sur une distance couvrant les positions -45 à -30. Récemment, Forget *et al.* (1997) ont montré que RAP74 et une des sous-unités de l'ARN pol II font également contact avec l'ADN entre -40 et -55 dans le contexte d'un complexe TBP-TFIIB-TFIIIE-TFIIF-ARN pol II. Cette hypothèse nous a poussé à vérifier les interactions de TFIIA avec les autres composantes du PIC. Plusieurs interactions entre différents polypeptides du PIC sont connues. Par contre, les interactions avec TFIIA sont très peu connues. Nous avons donc vérifié l'interaction de TFIIA avec plusieurs facteurs généraux ainsi qu'avec l'ARN pol II par chromatographie d'affinité.

Une certaine quantité du facteur à analyser, soit TBP, TFIIB, RAP30, RAP74, TFIIIE34, TFIIIE56 ou l'ARN pol II, a été immobilisée sur une colonne d'affigel 10. Ensuite, un échantillon de hTFIIA a été chargé sur la colonne. La liaison de TFIIA à la colonne contenant un facteur immobilisé est établie d'après le profil d'élution de TFIIA de la dite colonne. Ainsi, si TFIIA ne lie pas le facteur immobilisé, il se retrouvera dans la solution de passage ("Flowthrough") et dans la fraction de lavage à 0.1M NaCl. S'il y a une interaction entre TFIIA et le facteur immobilisé sur la colonne, TFIIA liera la matrice d'affinité et se retrouvera dans les éluats salins contenant 0.3M et 0.5M NaCl. Deux colonnes contrôles ont été effectuées, l'une servant de contrôle négatif et l'autre de contrôle positif, pour vérifier la spécificité des interactions. Le contrôle négatif consiste en une colonne contenant du BSA tandis que le contrôle positif est une colonne contenant  $\gamma$ TBPr dont l'interaction avec TFIIA a déjà été démontrée (Coulombe *et al.*, 1992). À la figure 8A et 8B, nous voyons le profil d'élution de TFIIA d'une colonne de  $\gamma$ TBPr et de BSA respectivement. Dans le cas d'une colonne de TBP, TFIIA se retrouve dans toutes les fractions d'élution mais surtout dans les fractions de 0.3M et 0.5M NaCl. Par comparaison, un polypeptide contaminant de la préparation TFIIA (contrôle) élue principalement dans la fraction de passage et dans celle du lavage à 0.1M. La différence du profil d'élution d'un polypeptide liant la colonne (TFIIA $\alpha$ ) ou non (contrôle) peut être clairement visualisé par une analyse photométrique représentée sur un graphique. Ainsi lorsque TFIIA ne



lie pas la colonne, les courbes de TFIIA et contrôle se superposent tandis que si TFIIA lie la colonne la courbe d'élution de TFIIA aura la forme d'un pic retardé par la colonne.

D'après les résultats de la figure 8 (A à H), nous concluons que TFIIA lie les facteurs généraux TBP, TFIIF et TFIIE. TFIIF est composé de deux sous-unités, soit RAP30 et RAP74. TFIIA lie TFIIF via RAP74 mais n'interagit pas avec RAP30. TFIIE est également composé de deux sous-unités soit TFIIE34 et TFIIE56. TFIIA a une interaction avec ses deux sous-unités. Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'interactions entre TFIIA et TFIIB ou l'ARN pol II.



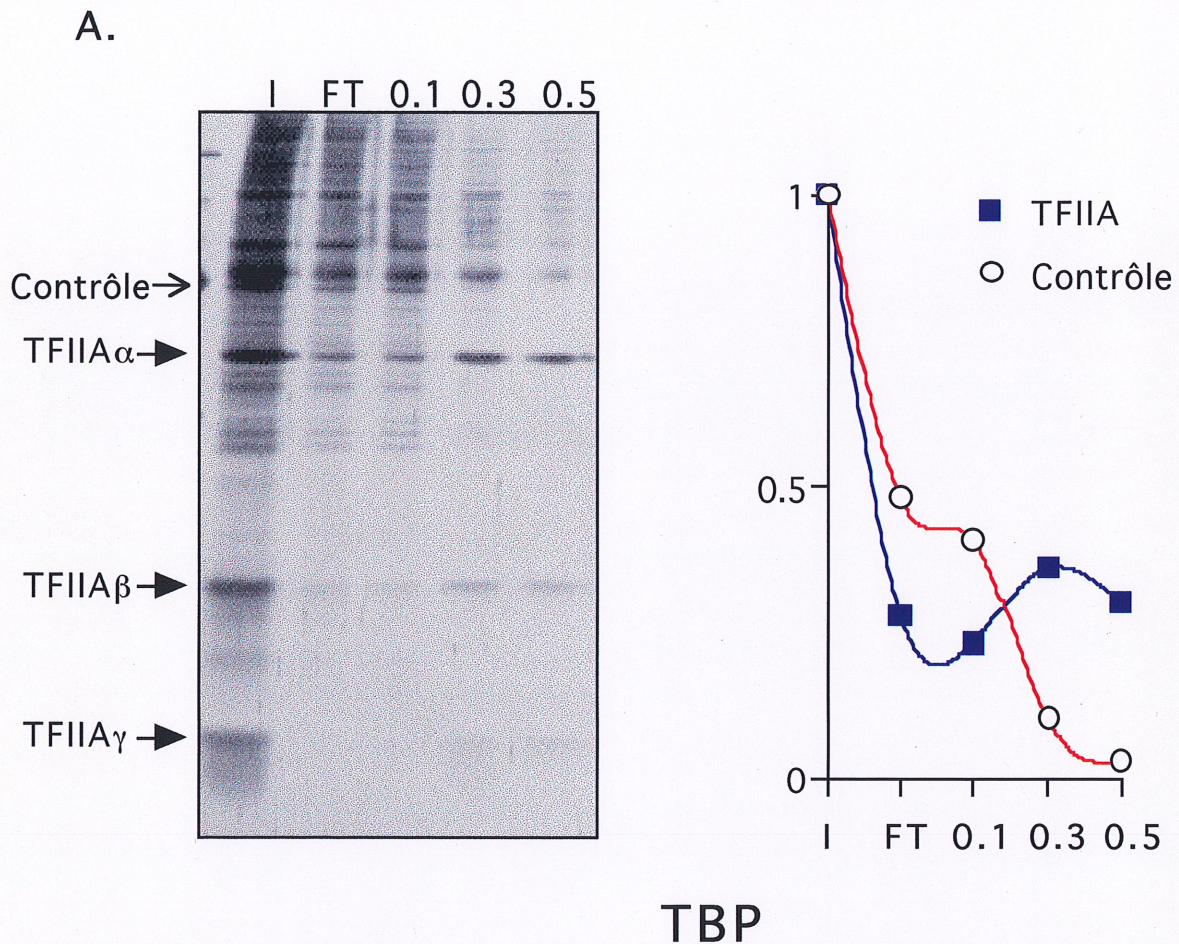
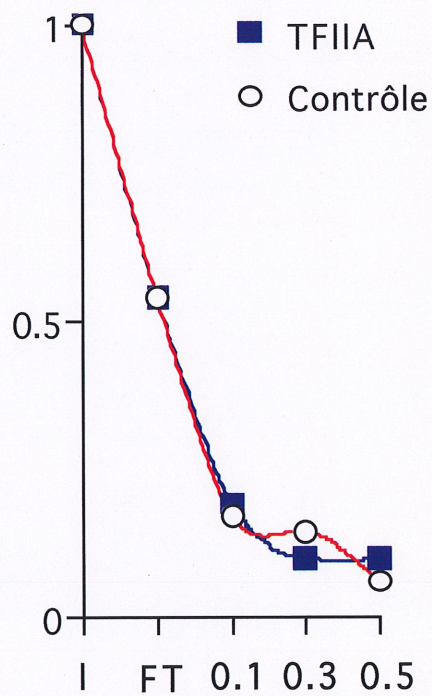
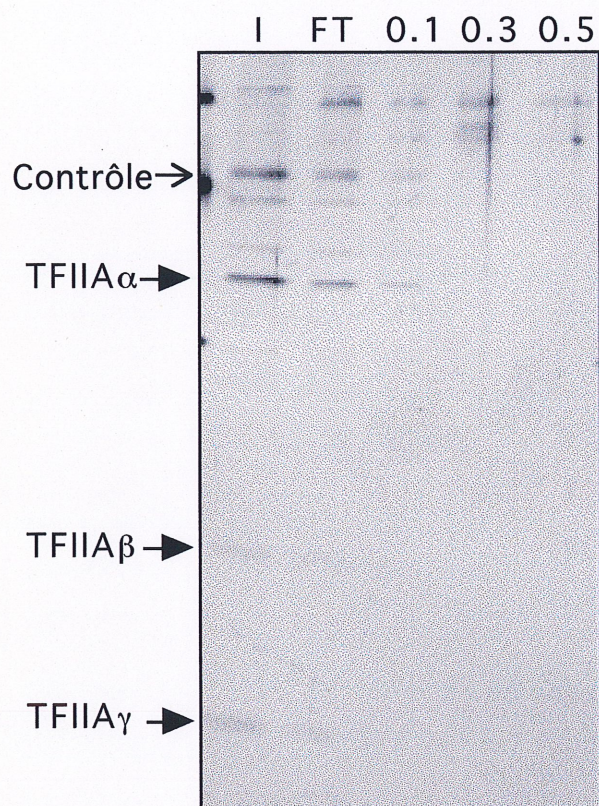


Figure 8. (A-H) Chromatographie d'affinité. Les protéines TBP (A), BSA (B), TFIIIB (C), TFIIIE34 (D), TFIIIE56 (E), RAP30 (F), RAP74 (G) et l'ARN pol II (H) ont été immobilisées sur des microcolonnes. 50  $\mu$ l de TFIIA ("Input", I) a été chargé sur chaque colonne. La solution passant outre ("Flowthrough", FT) a été conservée. Les colonnes ont ensuite été lavées avec 50  $\mu$ l du tampon contenant 0.1, 0.3 et 0.5M NaCl respectivement. Toutes les fractions ont été analysées sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent. La liaison de TFIIA a été quantifiée en mesurant l'intensité de la bande correspondant à TFIIA $\alpha$  dans chaque piste par densitométrie. Les résultats sont représentés sous forme graphique dans chaque cas. Un polypeptide contaminant a été utilisé comme contrôle négatif (contrôle).



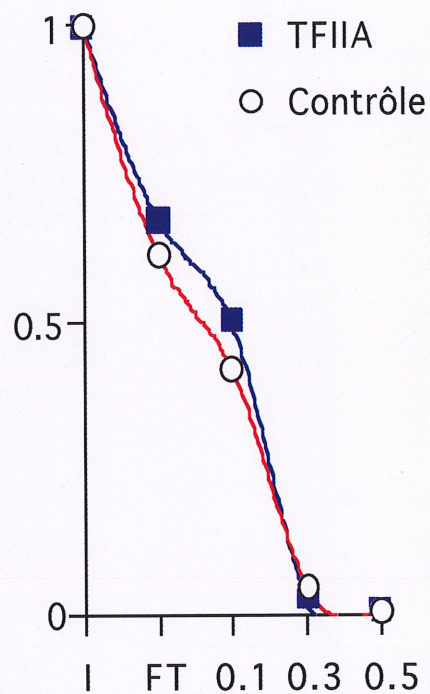
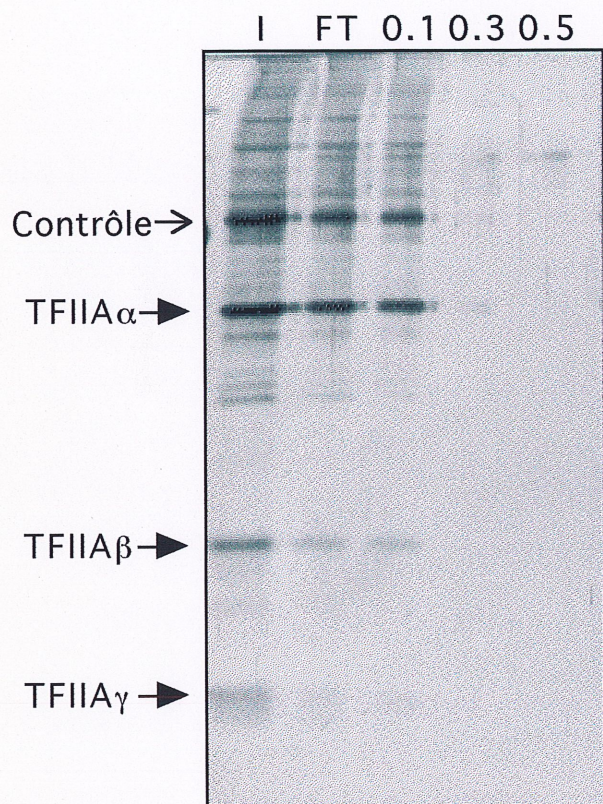
B.



BSA



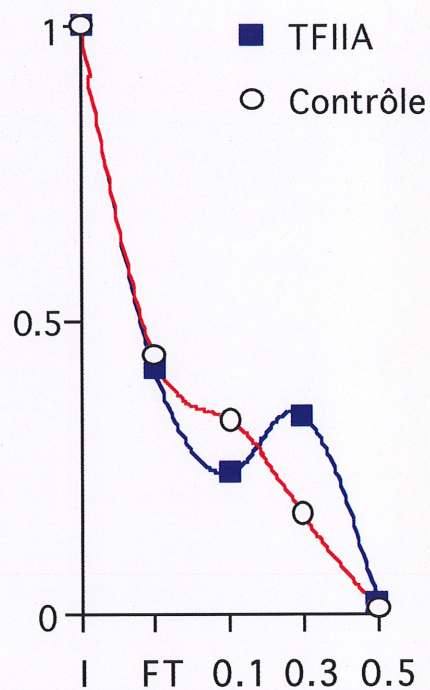
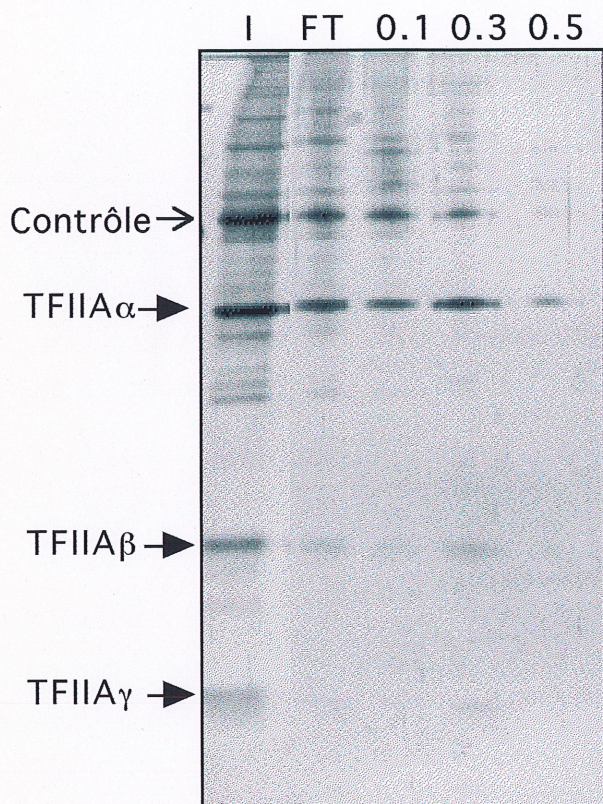
C.



TFIIB



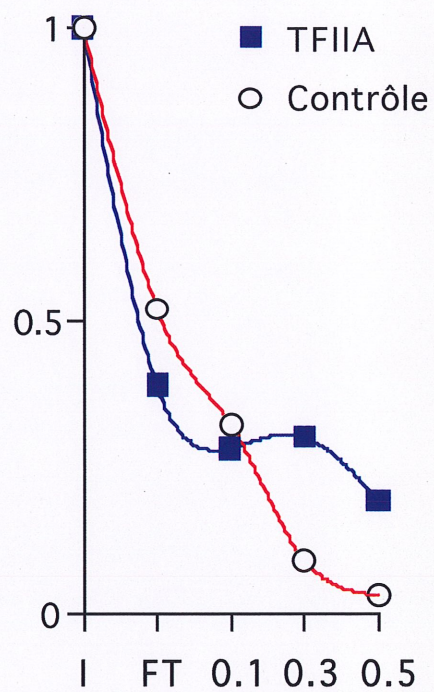
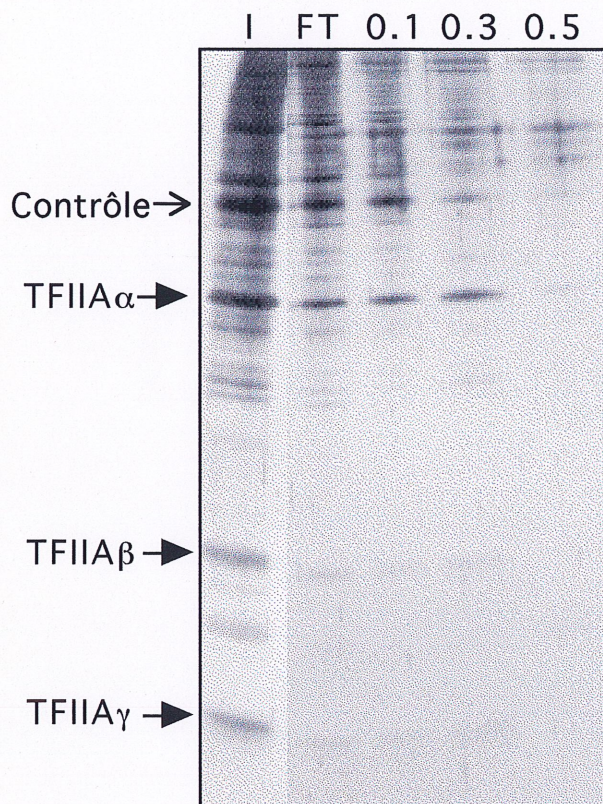
D.



TFIIE34



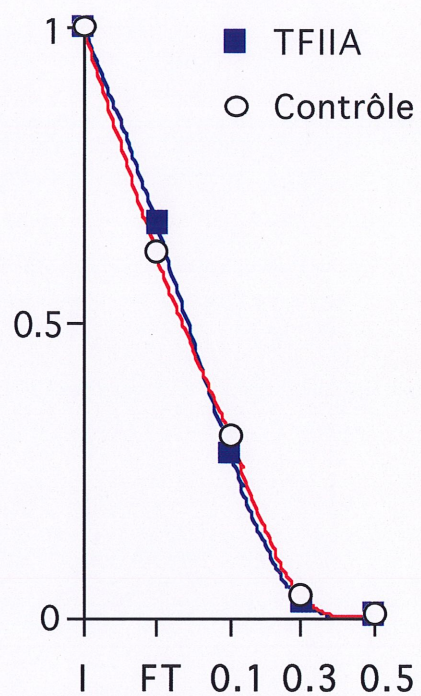
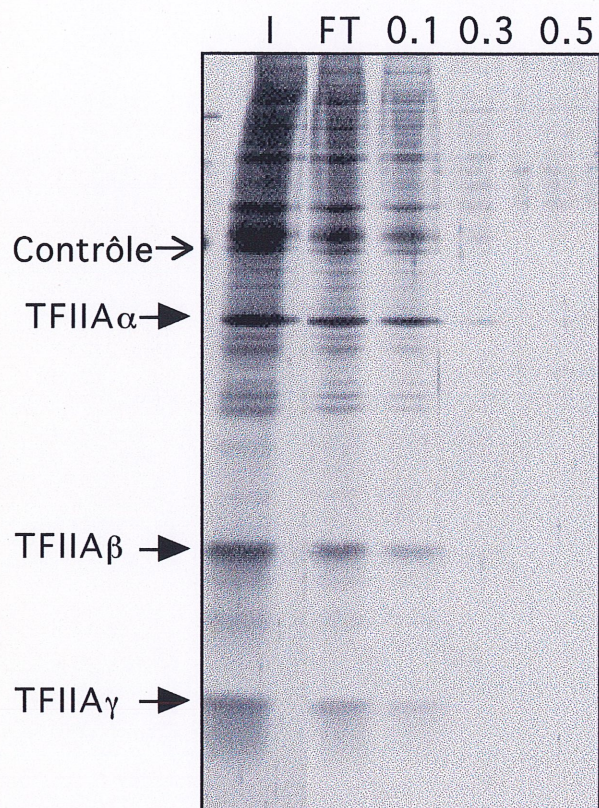
E.



TFIIIE56



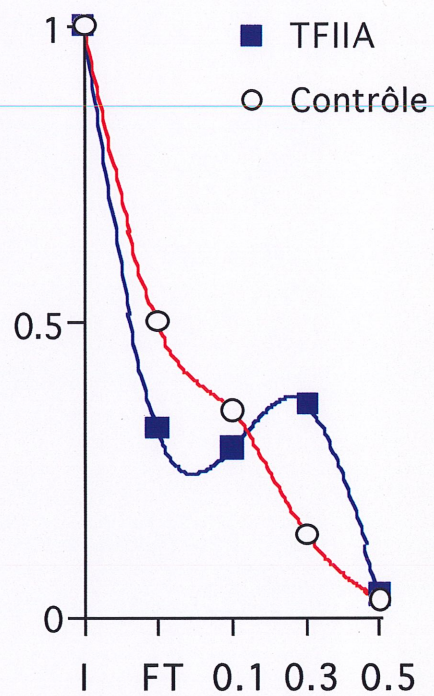
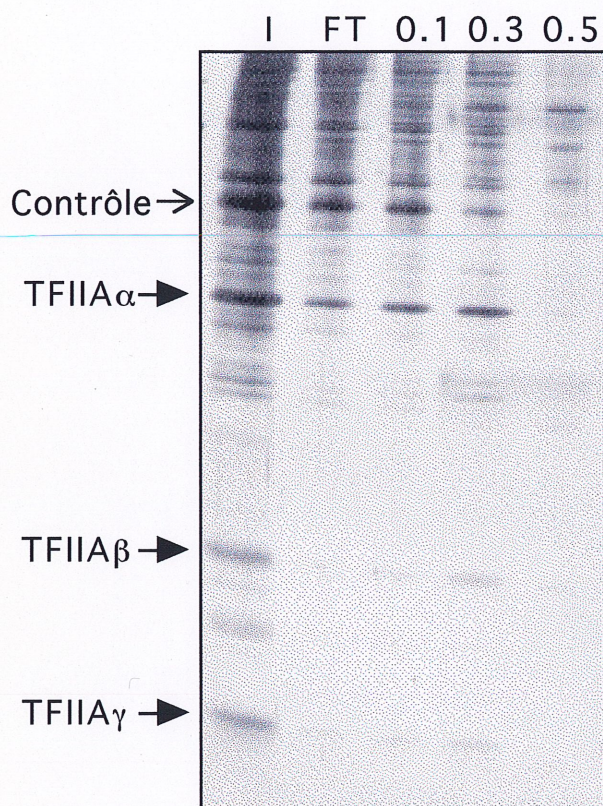
F.



RAP30



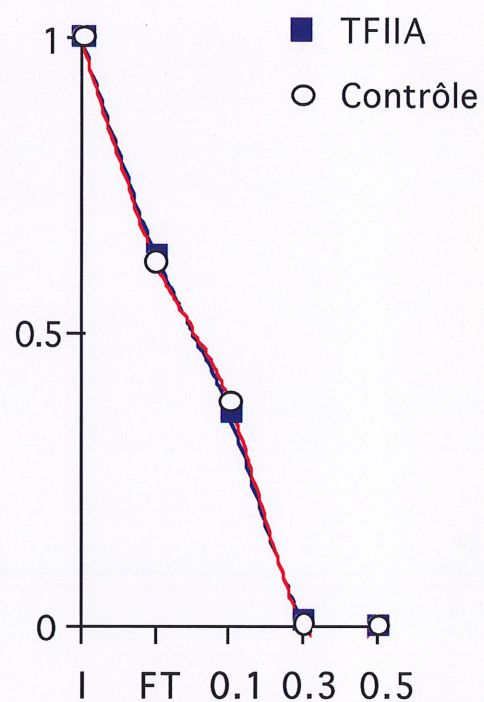
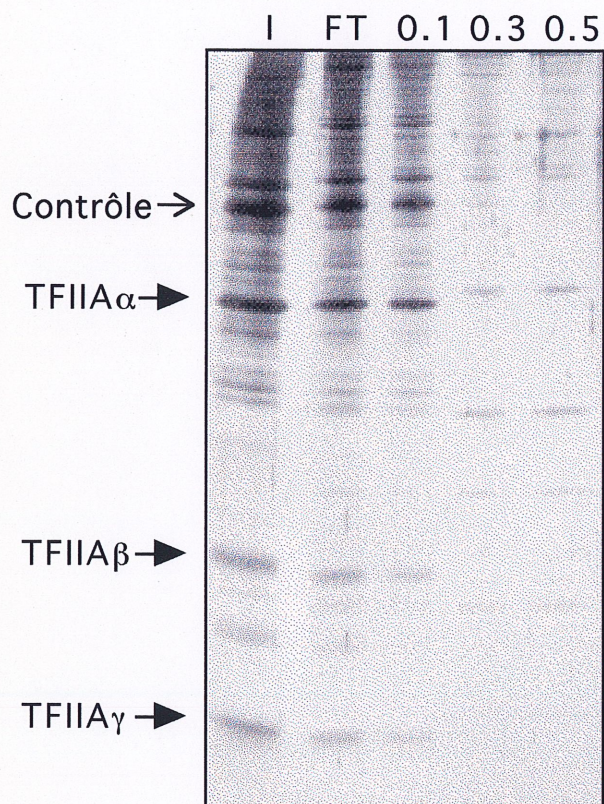
G.



RAP74



H.



ARN pol II



Tel que montré à la figure 9, la liaison de TFIIA à une colonne de RAP74 augmente en fonction de la concentration de RAP74 contenu sur la colonne (effect dose-réponse). Plusieurs colonnes sur lesquelles des quantités croissantes de RAP74 sont immobilisées ont été préparées, et la liaison à TFIIA a été évaluée. En passant de 0.8 à 1.6 mg RAP74/ml de résine, une augmentation de TFIIA $\alpha$  dans l'éluat à 0.5M NaCl est observée. Lorsque la concentration de RAP74 est augmentée à 3.2 mg/ml, TFIIA $\beta$  apparaît sur le gel coloré au nitrate d'argent. Finalement, à une concentration d'environ 6.4 mg/ml de RAP74, TFIIA $\gamma$  apparaît plus clairement. Ceci nous confirme que TFIIA lie RAP74 *in vitro*.



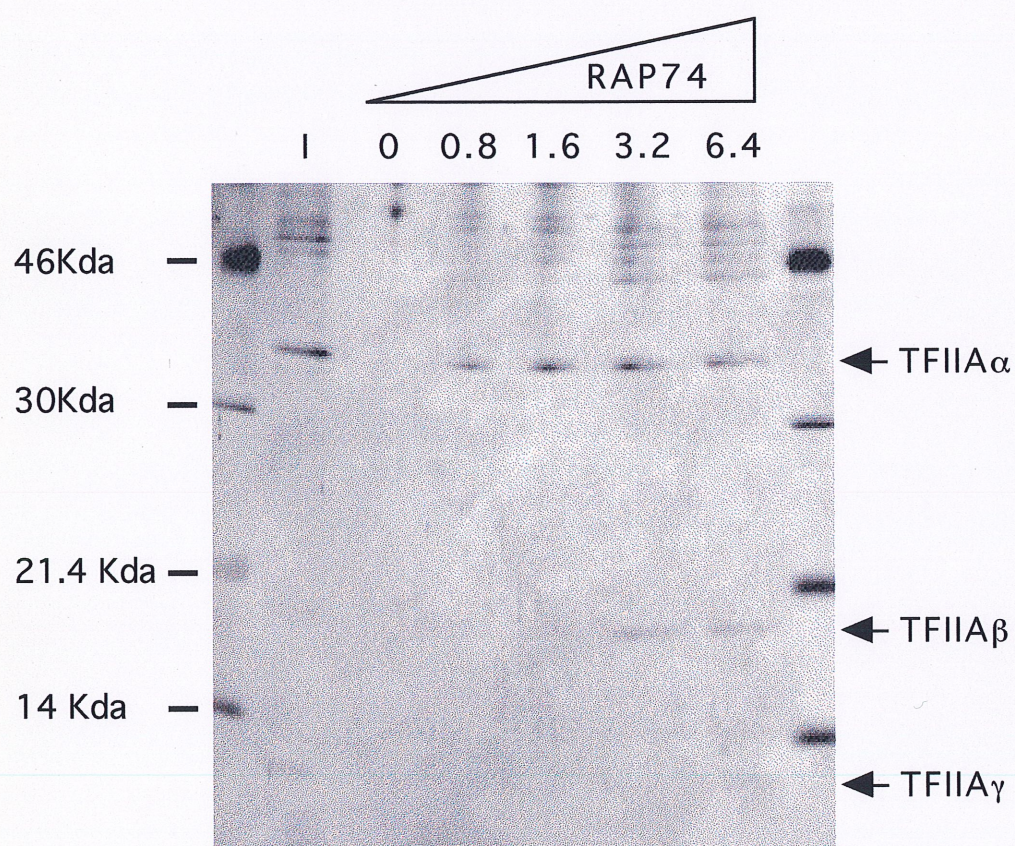


Figure 9. Effet dose-réponse de la liaison de TFIIA à RAP74. Une quantité égale du même échantillon de hTFIIA partiellement purifié ("Input", I) a été chromatographiée sur différentes colonnes contenant des quantités croissantes de RAP74 (entre 0 et 6.4 mg/ml de résine). L'analyse des éluats est faite telle que décrit dans la section matériel et méthodes. La position des sous-unités de TFIIA est indiquée par des flèches. Les positions des marqueurs de  $M_r$  sont indiquées.



## CHAPITRE 3

### DISCUSSION

#### 3.1. Structure du complexe ADN-yTBP-hTFIIA.

TFIIA s'associe aux promoteurs de type II lors d'une étape précoce de l'assemblage du PIC en liant directement TBP, liaison ayant pour effet de stabiliser la liaison TBP-ADN. TFIIA compétitionne aussi avec des facteurs négatifs pour la liaison à TBP et stimule la transcription basale dans un système de transcription *in vitro* partiellement purifié. De plus, TFIIA est impliqué comme coactivateur dans l'activation transcriptionnelle. En effet, plusieurs activateurs agissent en permettant l'entrée et la stabilisation d'un complexe TFIID-TFIIA-ADN au promoteur. Pour mieux comprendre le rôle de TFIIA en transcription, nous avons entrepris l'étude de la topologie du complexe TBP-TFIIA-ADN en utilisant la méthode de N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking. Ces études nous permettent de localiser précisément les positions de TBP et TFIIA le long du promoteur Ad2ML et ainsi comprendre mieux la structure de l'intermédiaire TBP-TFIIA-ADN.

Nos résultats jettent la lumière sur la topologie d'un complexe comprenant yTBP et hTFIIA partiellement purifié sur le promoteur Ad2ML. Ces résultats sont projetés sur le modèle à la figure 10. Ils démontrent que TFIIA s'enroule, en conjonction avec TBP, autour de l'ADN au niveau et en amont de la boîte TATA sur deux tours et demi d'hélice. Ainsi un pontage de TBP et/ou des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de TFIIA est obtenu à toutes les positions testées entre -20 et -48. L'ADN se retrouve ainsi pris dans un "étau" protéique. En effet, au niveau de la boîte TATA, TFIIA $\beta$  et TBP se retrouvent sur des faces opposées de l'hélice d'ADN. Il est intéressant de noter que les sondes -29/-31, -34 et -39/-40 placent le nucléotide photoréactif sur des faces opposées de l'hélice, et qu'à chacune de ces positions, TFIIA $\beta$  est fortement ponté. Il semble donc que TFIIA $\beta$  s'enroule autour de l'ADN sur un tour complet d'hélice. TFIIA $\alpha$  est restreint à une face de l'ADN, dans une région entre -40 et -50.



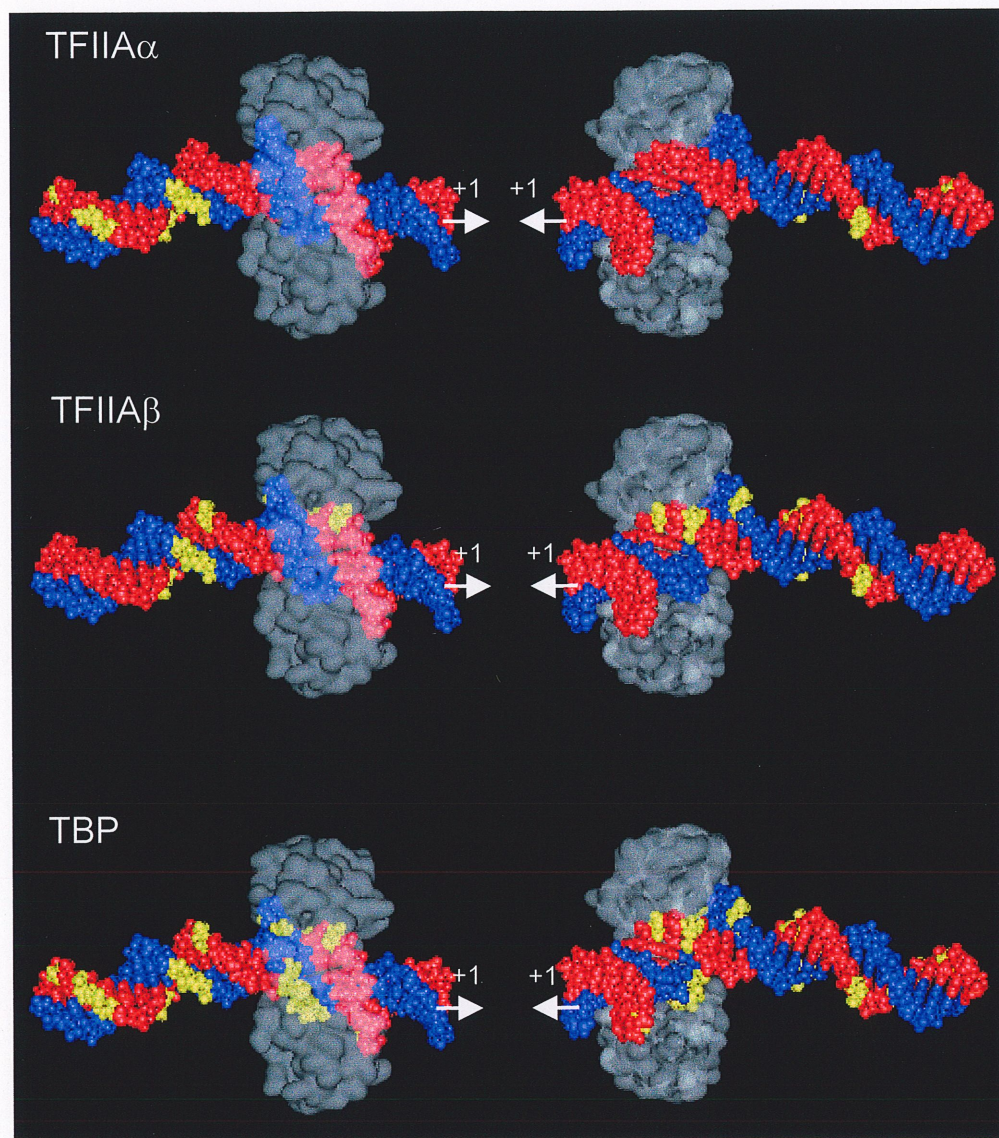


Figure 10. Modèle de la structure du complexe TBP-TFIIA-promoteur analysé par  $N_3R$ -dUMP-photocross-linking. Les sites où  $TFIIA\alpha$ ,  $TFIIA\beta$  et TBP sont pontés sont marqués en jaune sur la structure cristallographique du complexe chTBP associé au promoteur Ad2ML. Pour chaque sonde où un polypeptide est ponté le phosphate du nucléotide est en jaune. Pour chaque polypeptide, deux vues sont montrées. Une vue d'en haut (gauche), montrant chTBP chevauchant l'ADN et une vue d'en bas (droite). Dans chaque cas, le segment d'ADN en aval de la boîte TATA est indiqué par une flèche en direction du site +1. chTBP est représenté par la surface grise. Les brins codant et non-codant du promoteur Ad2ML sont représentés en rouge et bleu respectivement.



La région de superposition des deux sous-unités se situe entre -39 et -42. TBP a été ponté à toutes les photosondes utilisées, quoiqu'à des intensités différentes. Ces résultats suggèrent donc que TBP et TFIIA entourent le promoteur sur une distance d'environ 25 nucléotides entre -20 et -45. Le complexe TBP-TFIIA offre donc une importante surface d'interaction avec les autres FGTs et activateurs transcriptionnels.

Nos résultats de pontage sont en accord avec les résultats de cristallographie du complexe cyTBP-cyTFIIA-ADN obtenus récemment (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996). En effet, dans le crystal, TFIIA se retrouve exclusivement en amont de la boîte TATA. TOA1C, formant le baril  $\beta$  et correspondant à hTFIIA $\beta$ , forme des ponts d'hydrogène avec des phosphates placés dans la boîte TATA et 3 bases en amont, correspondant à la position -34 sur le promoteur Ad2ML. hTFIIA $\beta$  est ponté à la fois à la boîte TATA et à la position -34. Par contre la cristallographie n'explique pas le fait que TFIIA $\alpha$  soit ponté jusqu'à 17 paires de bases en amont de la boîte TATA. Notons cependant que le crystal ne contenait pas les résidus non-conservés 95-209 de TOA1, ce qui peut expliquer certaines divergences entre les résultats de pontage et ceux de la cristallographie.

Dans la structure cristallographique, yTBP est confiné à la boîte TATA tandis que nous observons un pontage de TBP jusqu'aux positions -45/-48. De plus, le patron de protection à la DNase I de TBP s'étend jusqu'à environ -45 (Coulombe *et al.*, 1992). Cette divergence s'explique facilement par le fait que, dans le crystal, seulement la partie conservée de yTBP comprenant les acides aminés 61 à 240 a été utilisée, la partie N-terminale étant tronquée. Nous suggérons que la partie non-conservée de TBP est située jusqu'à 17 paires de bases en amont de la boîte TATA.

Dernièrement, une nouvelle méthode de pontage a été développée et utilisée pour analyser les complexes TBP-TFIIA-ADN et TBP-TFIIA-TFIIB-ADN sur le promoteur Ad2ML. Dans ce cas, l'agent photoactivable est un phenyl-azide incorporé au phosphate de l'ADN (Lagrange *et al.*, 1996). Les résultats de Lagrange *et al.* (1996)

sont similaires à ceux obtenus dans notre étude omis certains détails. Lagrange *et al.* (1996) obtiennent un pontage de TFIIA $\gamma$  à la position -39 sur le brin non-codant. TFIIA $\beta$  est ponté en aval de la boîte TATA aux positions -22 et -20. Une autre différence est l'étendue du pontage de TBP. Dans leur étude, hTBP complet ou tronqué en N-terminal ont été utilisés. Dans les deux cas, le pontage se résume aux positions -31 et -22 sur le brin codant et -33 et -24 sur le brin non-codant, c'est-à-dire à chaque extrémité de la boîte TATA. Ils concluent donc que le pontage de TBP aux abords de la boîte TATA est causé par son extrémité C-terminale conservée. La différence dans les pontages peut s'expliquer par le fait que les groupements photoréactifs ne sondent pas des espaces équivalents dans les deux cas. Puisque le nitrène photoréactif utilisé par Lagrange *et al.* (1996) est incorporé sur le phosphate, nous pensons qu'il entre en contact avec des protéines placées plus près du squelette de phosphate de l'ADN. Notre incapacité à ponter TFIIA $\gamma$  réside probablement dans le fait que ce polypeptide est enfoui plus près du squelette de phosphate par des interactions avec TBP, TFIIA $\alpha$  et TFIIA $\beta$ . À l'inverse, la partie N-terminale de  $\gamma$ TBP est possiblement trop éloignée du squelette de phosphate pour faire contact avec le nucléotide photoréactif utilisé par Lagrange *et al.* (1996), mais pourrait interagir avec celui utilisé dans notre étude.

Il a été proposé que TFIIA s'assemble au complexe TBP-ADN via des interactions directes entre TBP et les sous-unités TFIIA $\beta$  et TFIIA $\gamma$ , tandis que TFIIA $\alpha$  est recruté indirectement par son interaction avec TFIIA $\gamma$  (Ma *et al.*, 1993; Yokomori *et al.*, 1994). Il n'est donc pas surprenant de ponter TFIIA $\beta$  au niveau ou tout près de la boîte TATA et TFIIA $\alpha$  plus en amont. TFIIA $\alpha$  pourrait ainsi être impliqué dans des interactions avec d'autres facteurs de transcription, tel des activateurs placés sur des séquences régulatrices en amont du promoteur. En accord avec cette hypothèse, un variant de hTFIIA dépourvu de la sous-unité  $\alpha$  ne répond pas à l'activation par VP16 (Ma *et al.*, 1996).

Une des fonctions de TFIIA est de contrecarrer la liaison de facteurs négatifs, tels NC2/Dr1 et Dr2/DNA topo I, à TBP, possiblement par un effet de compétition pour la liaison à ce dernier. Le fait de voir TBP et TFIIA s'enrouler conjointement sur une



vingtaine de nucléotides implique une grande interaction entre ces deux facteurs. TFIIA pourrait ainsi bloquer efficacement l'accès de facteurs négatifs qui lient TBP et qui nécessitent également une interaction avec l'ADN en amont de la boîte TATA. Par exemple, le facteur de régulation de la transcription Dr2/DNA topo I interagit avec l'ADN, au niveau du promoteur, à la fois en amont et en aval de la boîte TATA (Shykind *et al.*, 1997). De façon intéressante, la région en amont de la boîte TATA est nécessaire pour stabiliser l'interaction de TFIIA avec le complexe TBP-ADN, devenant probablement plus réfractaire à être déplacé par des facteurs négatifs (Weideman *et al.*, 1997). Il est également possible que TFIIA, en liant TBP et en s'enroulant autour de l'ADN, permette une meilleure liaison de ce dernier au promoteur. Cette enveloppe protéique formée par TBP et TFIIA serait une meilleure force d'attache à l'ADN. Par contre, il a été démontré que les possibles contacts en amont de la boîte TATA effectués par TFIIA ne stabilisaient pas l'interaction TBP-ADN mais stabilisaient plutôt l'interaction de TFIIA avec le complexe TBP-ADN (Weideman *et al.*, 1997).

### **3.2. bTFIIA est composé de trois sous-unités: $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ .**

L'analyse en SDS-PAGE de la préparation bTFIIA indique que ce facteur est composé de deux sous-unités de 19 et 12 kDa, soit de même  $M_r$  que les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  chez l'humain. bTFIIA peut stimuler la transcription basale *in vitro* dans un système comprenant des facteurs généraux partiellement purifiés. bTFIIA est aussi capable de modifier le patron de protection à la DNase I de TBP d'une manière identique à hTFIIA. Dans l'espoir de situer TFIIA $\gamma$  le long du promoteur, nous avons utilisé cette fraction dans nos expériences de pontage.

Des différences sont observées entre les complexes comprenant hTFIIA et bTFIIA. Ces disparités se situent aux positions -39/-40, -42 et -45/-48, tandis qu'au niveau et en aval de la boîte TATA, il n'existe pas de dissimilitude. Quatre bandes sont observées. Selon leur  $M_r$ , nous concluons qu'il s'agit de TBP, TFIIA $\beta$ , TFIIA $\gamma$  et, étonnamment, d'une quatrième bande de même  $M_r$  que hTFIIA $\alpha$ . Ces bandes

n'apparaissent pas en absence de TFIIA et sont spécifiques à la boîte TATA. Basé sur la spécificité des bandes et sur la similitude du  $M_r$  de ces bandes à celui des sous-unités de hTFIIA, ces résultats indiquent que bTFIIA est en fait composé de trois sous-unités de  $M_r$  de 35, 19 et 12 kDa. La grande sous-unité, qui n'apparaît pas stoechiométrique dans la préparation et qui peut même être indétectable dans certains cas, semble subir une protéolyse rapide tel que décrit dans cette étude (voir figure 7). L'hypothèse que les polypeptides de 12 kDa et/ou 19 kDa soient des produits de dégradation de TFIIA $\alpha$  n'a pas été écartée. Une identification plus sûre des bandes pontées de bTFIIA devra se faire par immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques aux différentes sous-unités. Au moment de terminer ce travail, de tels anticorps n'étaient pas disponibles.

Malgré le fait que bTFIIA occupe un espace aussi grand le long du promoteur que hTFIIA, s'enroulant autour de l'ADN en union avec TBP, la position relative des sous-unités n'est pas la même. La différence la plus significative est le pontage de TFIIA $\gamma$  à plusieurs positions entre -39 et -48. Il est intéressant de noter que Lagrange *et al.* (1996) obtiennent un pontage de hTFIIA $\gamma$  à la position -39 sur le brin non-codant du promoteur Ad2ML, soit une des positions examinées dans cette étude. Notons également que TFIIA $\gamma$  se retrouve à l'intersection des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  chez l'humain en accord avec un rôle dans le recrutement de la sous-unité  $\alpha$  à holo-TFIIA. Une autre différence est l'étendue du pontage de TFIIA $\beta$ . Contrairement à hTFIIA, bTFIIA $\beta$  s'étend jusqu'aux positions -45/-48 tandis que TFIIA $\alpha$  est situé dans une région très limitée entre -39 et -42. Ces différences pourraient être spécifiques à l'espèce et révéler un rôle variable de TFIIA. Différents patrons de pontage le long d'un même promoteur ont été observés entre hTFIIA et yTFIIA (Lagrange *et al.*, 1996). Une autre possibilité est que TFIIA $\alpha$  ne soit pas en proportion stoechiométrique dans notre fraction de bTFIIA, comme l'analyse en SDS-PAGE le suggère, et que la majorité des complexes assemblés ne possèdent pas TFIIA $\alpha$ . Une fraction de TFIIA dépourvue de la grande sous-unité est capable d'interagir avec TBP (Ma *et al.*, 1996). Nous avons démontré la protéolyse progressive de TFIIA $\alpha$  dans les fractions de bTFIIA. Dans ces conditions, TFIIA $\beta$  et TFIIA $\gamma$  pourraient s'assembler au promoteur et adopter une conformation particulière dans laquelle il serait possible de ponter TFIIA $\gamma$ .

### 3.3. TFIIA interagit avec des FGTs impliqués dans l'ouverture de l'hélice d'ADN.

Les interactions entre les composantes du PIC sont des déterminants primordiaux de sa structure et de sa fonction. Plusieurs de ces interactions ont été décrites. Quelques interactions impliquant TFIIA sont connues. Ainsi il interagit avec TFIID via ses sous-unités TBP et dTAF<sub>II</sub>110/hTAF<sub>II</sub>135. Par chromatographie d'affinité, nous avons mis en lumière des interactions entre TFIIA et deux FGTs, TFIIE et TFIIIF. TFIIE est composé des sous-unités TFIIE34 et TFIIE56. TFIIA interagit avec les deux sous-unités. TFIIIF est aussi composé de deux sous-unités: RAP30 et RAP74. Dans les conditions expérimentales utilisées, TFIIA interagit avec RAP74 mais pas avec RAP30. De plus, aucune interaction n'a pu être détectée avec l'ARN pol II et TFIIB.

Une étude antérieure proposait une interaction possible entre TFIIA et l'ARN pol II basée sur la proximité des résidus de TBP contactés par ces deux facteurs. Dans notre étude, nous ne détectons pas une telle interaction. La structure cristallographique du complexe TBP-TFIIB-ADN a révélé que TFIIB liait la région concave de TBP, sur la face opposée de l'hélice contactée par TFIIA, excluant toute interaction avec ce dernier. Nos résultats confirment cette proposition.

Nos résultats fournissent des informations sur le mécanisme d'action de TFIIA. Du point de vue structural, l'interaction entre TFIIA et RAP74 supporte des résultats récents de pontage qui indiquent que RAP74 est situé près des positions -39/-40 et -45/-48 en amont de la boîte TATA dans le contexte d'un complexe TBP-TFIIB-TFIIE-TFIIIF-ARN pol II (Forget *et al.*, 1997). Ces positions correspondent à celles où TFIIA est ponté. TFIIE34 a été ponté en aval de la boîte TATA juste en amont du site +1 aux positions -14/-2 et aussi en amont de la boîte TATA aux positions -39/-40. TFIIE56 n'a pas été localisé par N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking. D'un point de vue fonctionnel, TFIIA est considéré comme essentiel à l'activation mais dispensable lors de la transcription basale dans un système de transcription *in vitro* reconstitué avec des facteurs hautement purifiés. Pour cette raison il est souvent considéré comme

coactivateur. TFIIE et TFIIF jouent tous deux un rôle dans l'ouverture de l'hélice au site +1 (Pan et Greenblatt, 1994). Récemment, il a été proposé que TFIIE et TFIIF stimulent l'ouverture de l'hélice en provoquant un enroulement de l'ADN autour de l'ARN pol II (Forget *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1998). TFIIF est aussi impliqué lors de l'élongation de la transcription. L'interaction entre TFIIA et TFIIE et TFIIF pourrait établir un lien entre un activateur placé sur un "enhancer" et la machinerie transcriptionnelle stimulant l'ouverture de l'hélice d'ADN avant l'initiation de la transcription et/ou l'élongation. L'étude cristallographique du complexe TBP-TFIIA-ADN a démontré une grande surface de TFIIA accessible à des facteurs de transcription. Cette région correspond à l'amas d'hélices  $\alpha$  formé par les parties N-terminales de TOA1 et TOA2. Ces régions sont équivalentes à TFIIA $\alpha$  et TFIIA $\gamma$  respectivement chez l'humain.

## CONCLUSION

Cette étude permet de mieux comprendre les bases moléculaires régissant la fonction de TFIIA dans la transcription. D'une part, nous avons mieux caractérisé la structure d'un complexe TBP-TFIIA-ADN. D'autre part, nous avons mis en évidence des interactions protéine-protéine entre TFIIA et TFIIE et TFIIIF. La compréhension des interactions moléculaires entre TFIIA et l'ADN du promoteur et les FGTs est essentielle à une meilleure compréhension du rôle de ce facteur.

Ce travail nous a permis de mieux localiser TBP et les sous-unités de TFIIA le long du promoteur Ad2ML. Nous avons mis en évidence une grande région d'interaction entre le complexe protéique formé par TBP et TFIIA et le promoteur. Ainsi, TBP, en conjonction avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de TFIIA, entoure le promoteur sur une longueur de plus de deux tours d'hélice, entre les positions -20 et -48. Cette région offre une grande surface d'interaction avec des protéines régulatrices et permet une meilleure stabilisation du complexe TBP-ADN, permettant de contrecarrer l'effet de certains inhibiteurs de la transcription.

Un des buts de cette étude était de localiser la petite sous-unité de TFIIA, TFIIA $\gamma$ , le long du promoteur Ad2ML. Lorsqu'une préparation TFIIA de cellules humaines Hela a été utilisée, TFIIA $\gamma$  n'a été ponté à aucune des positions étudiées. Par contre, l'utilisation d'une préparation bTFIIA a permis de ponter un polypeptide de  $M_r \sim 12$  kDa, en amont de la boîte TATA, aux positions -39/-40, -42 et -45/-48. Nous croyons que ce polypeptide correspond à TFIIA $\gamma$  sur la base (i) de son  $M_r$ , (ii) du fait qu'il n'est pas ponté en absence de TFIIA et (iii) du fait qu'il n'est pas ponté lorsqu'une sonde ayant une boîte TATA mutée a été utilisée. L'identification définitive devra faire appel à des anticorps spécifiques à la sous-unité. Il serait maintenant intéressant d'étudier, par N<sub>3</sub>R-dUMP-photocross-linking, la structure du PIC comprenant tous les FGTs ainsi que l'ARN pol II en présence de TFIIA.

La position de TFIIA le long du promoteur Ad2ML nous a poussé à étudier ses interactions avec les autres FGTs. Cette étude a révélé des interactions protéine-protéine entre TFIIA et les FGTs TFIIE et TFIIIF. TFIIA interagit avec les deux sous-unités de TFIIE et avec la sous-unité RAP74 de TFIIIF. Il est connu que TFIIA est nécessaire lors de l'activation de la transcription *in vitro* et *in vivo* mais non lors de la transcription basale. Il est considéré comme un coactivateur. Comme tel, il interagit avec divers domaines activateurs. L'interaction entre TFIIA, TFIIE et TFIIIF nous permet de proposer une connection intermoléculaire entre un activateur et le PIC via TFIIA. Un activateur pourrait donc moduler les étapes impliquant TFIIE et TFIIIF grâce à TFIIA. TFIIA pourrait être impliqué dans l'enroulement de l'ADN autour du PIC, l'ouverture de l'hélice et/ou l'élongation.

Pour mieux définir la fonction des interactions décrites dans cette étude, il sera nécessaire, en premier lieu, d'identifier les sous-unités de TFIIA responsables des interactions et les régions précises des sous-unités participant à cette activité de liaison. En deuxième lieu, il sera nécessaire d'utiliser divers mutants de TFIIA incapables d'interagir avec TFIIE et/ou TFIIIF et de corréler cette absence d'interaction avec une activité fonctionnelle, soit la coactivation ou l'anti-répression. Il sera important d'identifier précisément quelle(s) étape(s) de la transcription est(sont) modulées par TFIIA. Ces nouvelles données tracent donc la voie à une meilleure compréhension du rôle de TFIIA dans la transcription et aussi une meilleure compréhension du mécanisme d'action des activateurs via TFIIA.

## BIBLIOGRAPHIE

AKOULITCHEV, S., T.P. MÄKELÄ, R.A. WEINBERG et D. REINBERG. 1995. Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 377:557-560.

AUBLE, D.T. et S. HAHN. 1993. An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA. *Genes & Dev.* 7:844-856.

AUBLE, D.T., K.E. HANSEN, C.G.F. MUELLER, W.S. LANE, J. THORNER et S. HAHN. 1994. Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes & Dev.* 8:1920-1934.

BARBERIS, A., J. PEARLBERG, N. SIMKOVICH, S. FARRELL, P. REINAGEL, C. BAMDAD, G. SIGAL et M. PTASHNE. 1995. Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell* 81:359-368.

BENTLEY, D.L. 1995. Regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:210-216.

BERNSTEIN, R., J. DEJONG et R. ROEDER. 1994. Characterization of the highly conserved TFIIA small subunit from *Drosophila melanogaster*. *J.Biol.Chem.* 269:24361-24366.

BROWNELL, J.E., J. ZHOU, T. RANALLI, R. KOBAYASHI, D.G. EDMONDSON, S.Y. ROTH et C.D. ALLIS. 1996. *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84:843-851.

BUERMEYER, A.B., L.A. STRASHEIM, S.L. McMAHON et P.J. FARNHAM. 1995. Identification of cis-acting elements that can obviate a requirement for the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 270:6798-6807.

BURATOWSKI, S., S. HAHN, P.A. SHARP et L. GUARENTE. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56:549-561.

BURATOWSKI, S. et H. ZHOU. 1992. Transcription factor IID mutants defective for interaction with transcription factor IIA. *Nature* 255:1130-1132.

BURLEY S.K. et R.G. ROEDER. 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* 65:769-799.

CHAMBERS, R.S. et M.E. DAHMUS. 1994. Purification and characterization of a phosphatase from Hela cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 269:26243-26248.

CHANG, M. et J.A. JAEHNING. 1997. A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 25: 4861-4865.

CHAO, D.M., E.L. GADBOIS, P.J. MURRAY, S.F. ANDERSON, M.S. SONU, J.D. PARVIN et R.A. YOUNG. 1996. A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 380:82-85.

CHATTERJEE, S. et K. STRUHL. 1995. Connecting a promoter-bound protein to TBP bypasses the need for a transcriptional activator. *Nature* 374:820-823.

CHEN, J-L., L.D. ATTARDI, C.P. VERRIJZER, K. YOKOMORI et R. TJIAN. 1994. Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79: 93-105.

CHI, T. et M. CAREY. 1993. The ZEBRA activation domain: modular organization and mechanism of action. *Mol.Cell.Biol.* 13:7045-7055.

CHI, T. et M. CAREY. 1996. Assembly of the isomerized TFIIA-TFIID-TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation. *Genes & Dev.* 10:2540-2550.

CHI, T., P. LIEBERMAN, K. ELLWOOD et M. CAREY. 1995. A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature* 377:254-257.

CHOY B. et M.R. GREEN. 1993. Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature* 366:531-536.

CORTES, P., O. FLORES et D. REINBERG. 1992. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor IIJ. *Mol.Cell.Biol.* 12:413-421.

COTÉ, J., J. QUINN, J.L. WORKMAN et C.L. PETERSON. 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265:53-60.

COULOMBE, B., J. LI et J. GREENBLATT. 1994. Topological localization of the human transcription factors IIA, IIB, TATA box-binding protein, and RNA polymerase II-associated protein 30 on a class II promoter. *J. Biol. Chem.* 269:19962-19967.



COULOMBE, B., M. KILLEEN, P. LILJELUND, B. HONDA, H. XIAO, C.J. INGLES et J. GREENBLATT. 1992. Identification of three mammalian proteins that bind to the yeast TATA box protein TFIID. *Gene Exp.* 2:99-110.

COWELL, I.G. 1994. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem. Sci.* 19: 38-42.

CUJEC, T.P., H. CHO, E. MALDONADO, J. MEYER, D. REINBERG et B.M. PETERLIN. The human immunodeficiency virus transactivator tat interacts with the RNA polymerase II holoenzyme. 1997. *Mol. Cell. Biol.* 17:1817-1823.

DAHMUS, M.E. 1995. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1261:171-182.

DAHMUS, M.E. 1996. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 271:19009-19012.

DAVISON, B.L., J.-M. EGLY, E.R. MULVIHILL et P. CHAMBON. 1983. Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* 301:680-686.

DEJONG, J., R. BERNSTEIN et R.G. ROEDER. 1995. Human general transcription factor TFIIA: characterization of a cDNA encoding the small subunit and requirement for basal and activated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3313-3317.

DEJONG, J. et R.G. ROEDER. 1993. A single cDNA, hTFIIA/ $\alpha$ , encodes both the p35 and p19 subunits of human TFIIA. *Genes & Dev.* 7:2220-2234.

DIKSTEIN, R., S. RUPPERT et R. TJIAN. 1996. TAF<sub>II</sub>250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell* 84:781-790.

DYNLACHT B.D., T. HOEY et R. TJIAN. 1991. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66:563-576.

FLORES, O., H. LU, M. KILLEEN, J. GREENBLATT, Z.F. BURTON et D. REINBERG. 1991. The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9999-10003.

FORGET, D., F. ROBERT, G. GRONDIN, Z.F. BURTON, J. GREENBLATT et B. COULOMBE. 1997. RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7150-7155.

GAUDREAU, L., A. SCHMID, D. BLASCHKE, M. PTASHNE et W. HÖRZ. 1997. RNA polymerase II holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast PHO5 promoter. *Cell* 89:55-62.

GEIGER, J.H., S. HAHN, S. LEE et P.B. SIGLER. 1996. Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science* 272:830-836.

GODDE, J.S., Y. NAKATINI et A.P. WOLFFE. 1995. The amino-terminal tails of the core histones and the translational position of the TATA box determine TBP/TFIIA association with nucleosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 23:4547-4564.

GONZALEZ-COUTO, E., N. KLAGES et M. STRUBIN. 1997. Synergistic and promoter-selective activation of transcription by recruitment of transcription factors TFIID and TFIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8036-8041.

GOODRICH, J.A. et R. TJIAN. 1994. Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II. *Cell* 77:145-156.

GOODRICH, J.A., T. HOEY, C.J. THUT, A. ADMON et R. TJIAN. 1993. *Drosophila* TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* 75:519-530.

GREENBLATT, J. 1997. RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:310-319.

HA, I., W.S. LANE et D. REINBERG. 1991. Cloning of a human gene encoding the general transcription initiation factor IIB. *Nature* 352:689-695.

HA, I., S. ROBERTS, E. MALDONADO, X. SUN, L-U. KIM, M. GREEN et D. REINBERG. 1993. Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II. *Genes & Dev.* 7:1021-1032.

HANNA-ROSE, W. et U. HANSEN. 1996. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Gen.* 12:229-234.

HENGARTNER, C.J., C.M. THOMPSON, J. ZHANG, D.M. CHAO, S-M. LIAO, A.J. KOLESKE, S. OKAMURA et R.A. YOUNG. 1995. Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes & Dev.* 9:897-910.

HOEY, T., B.D. DYNLACHT, M.G. PETERSON, B.F. PUGH et R. TJIAN. 1990. Isolation and characterization of the *Drosophila* gene encoding the TATA box binding protein, TFIID. *Cell* 61:1179-1186.

HOFFMANN, A., C.-M. CHIANG, T. OELGESCHLÄGER, X. XIE, S.K. BURLEY, Y. NAKATANI et R.G. ROEDER. 1996. A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature* 380:356-359.

HOLSTEGE, F.C.P., D. TANTIN, M. CAREY, P.C. VAN DER VLIET et H.Th.M. TIMMERS. 1995. The requirement for the basal transcription factor IIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *EMBO J.* 14:810-819.

HOLSTEGE, F.C.P., P.C. VAN DER VLIET et H.Th.M. TIMMERS. 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* 15:1666-1677.

HORIKOSHI, M., M.F. CAREY, H. KAKIDANI et R.G. ROEDER. 1988a. Mechanism of action of a yeast activator: direct effect of GAL4 derivatives on mammalian TFIID-promoter interactions. *Cell* 54:665-669.

HORIKOSHI, M., T. HAI, Y.-S. LIN, M. GREEN et R.G. ROEDER. 1988b. Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell* 54:1033-1042.

IMBALZANO, A.N., K.S. ZARET et R.E. KINGSTON. 1994a. Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J. Biol. Chem.* 11:8280-8286.

IMBALZANO, A.N., H. KWON, M.R. GREEN et R.E. KINGSTON. 1994b. Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370:481-485.

INGLES, C.J., M. SHALES, W.D. CRESS, S.J. TRIEZENBERG et J. GREENBLATT. 1991. Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature* 351:588-590.

INOSTROZA, J., F.H. MERMELSTEIN, I. HA, W.S. LANE et D. REINBERG. 1992. Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* 70:477-489.

JOLIOT, V., M. DEMMA et R. PRYWES. 1995. Interaction with RAP74 subunit of TFIIF is required for transcriptional activation by serum response factor. *Nature* 373:632-635.

JUO, Z.S., T.K. CHIU, P.M. LEIBERMAN, I. BAIKALOV, A.J. BERK et R.E. DICKERSON. 1996. How proteins recognize the TATA box. *J. Mol. Biol.* 261:239-254.

KAUFMANN, J. et S.T. SMALE. 1994. Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes & Dev.* 8:821-829.

KAISER, K., G. STELZER et M. MEISTERERNST. 1995. The coactivator p15 (PC4) initiates transcriptional activation during TFIIA-TFIID-promoter complex formation. EMBO J. 14:3520-3527.

KANG, J.J., D.T. AUBLE, J.A. RANISH et S. HAHN. 1995. Analysis of the yeast transcription factor TFIIA: distinct functional regions and a polymerase II-specific role in basal and activated transcription. Mol. Cell. Biol. 15:1234-1243.

KASHANCHI, F., S.N. KHLEIF, J.F. DUVALL, M.R. SADAIE, M.F. RADONOVICH, M. CHO, M.A. MARTIN, S-Y. CHEN, R. WEINMANN et J.N. BRADY. 1996. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 tat with a unique site of TFIID inhibits negative cofactor Dr1 and stabilizes the TFIID-TFIIA complex. J. Virol. 70:5503-5510.

KEPHART, D.D., B.Q. WANG, Z.F. BURTON et D.H. PRICE. 1994. Functional analysis of *Drosophila* factor 5 (TFIIF), a general transcription factor. J. Biol. Chem. 269:13536-13543.

KILLEEN, M., B. COULOMBE et J. GREENBLATT. 1992. Recombinant TBP, transcription factor IIB, and RAP30 are sufficient for promoter recognition by mammalian RNA polymerase II. J. Biol. Chem. 267:9463-9466.

KIM, J., J.D. PARVIN, B.M. SHYKIND et P.A. SHARP. 1996. A negative cofactor containing Dr1/p19 modulates transcription with TFIIA in a promoter-specific fashion. J. Biol. Chem. 271:18405-18412.

KIM, J.L. et S.K. BURLEY. 1994. 1.9A resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG. Nat. Struct. Biol. 1:638-653.

KIM, J.L., D.B. NIKOLOV et S. BURLEY. 1993a. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. Nature 365:520-527.

KIM, T.-K., S. HASHIMOTO, R.J. KELLEHER III, P.M. FLANAGAN, R.D. KORNBERG, M. HORIKOSHI et R.G. ROEDER. 1994a. Effects of activation-defective TBP mutations on transcription initiation in yeast. Nature 369:252-255.

KIM T.-K., T. LAGRANGE, Y.-H. WANG, J.D. GRIFFITH, D. REINBERG et R.H. EBRIGHT. 1997. Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12268-12273.

KIM, T.-K., Y. ZHAO, H. GE, R. BERNSTEIN et R.G. ROEDER. 1995. TATA-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. J. Biol. Chem. 270:10976-10981.

KIM, Y., J.H. GEIGER, S. HAHN et P.B. SIGLER. 1993b. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 365:512-520.

KIM, Y.-J., S. BJÖRKLUND, Y. LI, M.H. SAYRE et R.D. KORNBERG. 1994b. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77:599-608.

KITAJIMA, S., T. CHIBAZAKURA, M. YONAHARA et Y. YASUKOCHI. 1994. Regulation of the human general transcription initiation factor TFIIF by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269:29970-29977.

KLAGES, N. et M. STRUBIN. 1995. Stimulation of RNA polymerase II transcription initiation by recruitment of TBP *in vivo*. *Nature* 374:822-823.

KOBAYASHI, N., T.G. BOYER et A.J. BERK. 1995. A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly. *Mol. Cell. Biol.* 15:6465-6473.

KOLESKE, A.J. et R.A. YOUNG. 1994. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368:466-469.

KOLESKE, A.J. et R.A. YOUNG. 1995. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20: 113-116.

KRAUS, V.B., J.A. INOSTROZA, K. YEUNG, D. REINBERG et J.R. NEVINS. 1994. Interaction of the Dr1 inhibitory factor with the TATA binding protein is disrupted by adenovirus E1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6279-6282.

LAGRANGE, T., T.-K. KIM, G. ORPHANIDES, Y.W. EBRIGHT, R.H. EBRIGHT et D. REINBERG. 1996. High-resolution mapping of nucleoprotein complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10620-10625.

LAYBOURN, P.J. et M.E. DAHMUS. 1990. Phosphorylation of RNA polymerase IIa occurs subsequent to interaction with the promoter and before the initiation of transcription. *J. Biol. Chem.* 265:13165-13173.

LAYBOURN, P.J. et J.T. KADONAGA. 1991. Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science* 254:238-245.

LEE, D.K., J. DEJONG, S. HASHIMOTO, M. HORIKOSHI et R.G. ROEDER. 1992. TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat. *Mol. Cell. Biol.* 12:5189-5196.

LEE, M. et K. STRUHL. 1995. Mutations on the DNA-binding surface of TATA-binding protein can specifically impair the response to acidic activators *in vivo*. Mol. Cell. Biol. 15:5461-5469.

LEE, S. et S. HAHN. 1995. Model for binding of transcription factor TFIIB to the TBP-DNA complex. Nature 376:609-612.

LI, Y., P.M. FLANAGAN, H. TSCHOCHNER et R.D. KORNBERG. 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. Science 263:805-807.

LIAO, S., J. ZHANG, D.A. JEFFERY, A.J. KOLESKE, C.M. THOMPSON, D.M. CHAO, M. VILJOEN, H.J.J. VAN VUREN et R.A. YOUNG. 1995. A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. Nature 374:193-196.

LIEBERMAN, P. et A.J. BERK. 1994. A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA-promoter DNA complex formation. Genes & Dev. 8:995-1006.

LIN, Y-S., I. HA, E. MALDONADO, D. REINBERG et M.R. GREEN. 1991. Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. Nature 353:569-571

LIN, Y-S. et M.R. GREEN. 1991. Mechanism of action of an acidic transcriptional activator *in vitro*. Cell 64:971-981.

LU, H., O. FLORES, R. WEINMANN et D. REINBERG. 1991. The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10004-10008.

MA, D., H. WATANABE, F. MERMELSTEIN, A. ADMON, K. OGURI, X. SUN, T. WADA, T. SHIROYA, D. REINBERG et H. HANDA. 1993. Isolation of a cDNA encoding the largest subunit of TFIIA reveals functions important for activated transcription. Genes & Dev. 7:2246-2257.

MA, D., I. OLAVE, A. MERINO et D. REINBERG. 1996. Separation of the transcriptional coactivator and antirepression functions of transcription factor IIA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:6583-6588.

MALDONADO, E. et D. REINBERG. 1995. News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. Curr. Biol. 7:352-361.

MALDONADO, E., I. HA, P. CORTES, L. WEIS et D. REINBERG. 1990. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II; role of transcription factors IIA, IID, and IIB during formation of a transcription-competent complex. Mol. Cell. Biol. 10:6335-6347.

MALDONADO, E., R. SHIEKHATTAR, M. SHELDON, H. CHO, R. DRAPKIN, P. RICKERT, E. LEES, C.W. ANDERSON, S. LINN et D. REINBERG. 1996. A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* 381:86-89.

MATSUI, T., J. SEGALL, P.A. WEIL et R.G. ROEDER. 1980. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255:11992-11996.

MAXON, M.E., J.A. GOODRICH et R. TJIAN. 1994. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIF: a model for promoter clearance. *Genes & Dev.* 8:515-524.

MERINO, A., K.R. MADDEN, W.S. LANE, J.J. CHAMPOUX et D. REINBERG. 1993. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* 365:227-232.

MIZZEN, C.A., X-J. YANG, T. KOKUBO, J.E. BROWNELL, A.J. BANNISTER, T. OWEN-HUGHES, J. WORKMAN, L. WANG, S.L. BERGER, T. KOUZARIDES, Y. NAKATANI et C.D. ALLIS. 1996. The TAF<sub>II</sub>250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87:1261-1270.

MOQTADERI, Z., Y. BAI, D. POON, P.A. WEIL et K. STRUHL. 1996. TBP-associated factors are not generally required for transcriptional activation in yeast. *Nature* 383: 188-191.

NAKATANI, Y., S. BAGBY et M. IKURA. 1996. The histone folds in transcription factor TFIID. *J. Biol. Chem.* 271:6575-6578.

NELSON, H.C.M. 1995. Structure and function of DNA-binding proteins. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 5:180-189.

NIKOLOV, D.B., H. CHEN, E.D. HALAY, A.A. USHEVA, K. HISATAKE, D.K. LEE, R.G. ROEDER et S.K. BURLEY. 1995. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377:119-128.

OELGESCHLÄGER, T., C-M. CHIANG et R.G. ROEDER. 1996. Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature* 382:735-738.

ORPHANIDES, G., T. LAGRANGE et D. REINBERG. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes & Dev.* 10:2657-2683.

OSSIPOW, V., J-P. TASSAN, E.A. NIGG et U. SCHIBLER. 1995. A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell* 83:137-146.

OZER, J., A.H. BOLDEN et P.M. LIEBERMAN. 1996. Transcription factor IIA mutations show activator-specific defects and reveal a IIA function distinct from stimulation of TBP-DNA binding. J.Biol.Chem. 271:11182-11190.

OZER, J., P.A. MOORE, A.H. BOLDEN, A. LEE, C.A. ROSEN et P.M. LIEBERMAN. 1994. Molecular cloning of the small ( $\gamma$ ) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription. Genes & Dev. 8:2324-2335.

PAN, G., T. ASO et J. GREENBLATT. 1997. Interaction of elongation factors TFIIS and elongin A with a human RNA polymerase II holoenzyme capable of promoter-specific initiation and responsive to transcriptional activators. J. Biol. Chem. 272:24563-24571.

PAN, G. et J. GREENBLATT. 1994. Initiation of transcription by RNA polymerase II is limited by melting of the promoter DNA in the region immediately upstream of the initiation site. J. biol. Chem. 269:30101-30104.

PARADA, C.A. et R.G. ROEDER. 1996. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. Nature 384:375-378.

PARANJAPE, S.M., R.T. KAMAKAKA et J.T. KADONAGA. 1994. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. Annu. Rev. Biochem. 63:265-297.

PARVIN, J.D., B.M. SHYKIND, R.E. MEYERS, J. KIM et P.A. SHARP. 1994. Multiple sets of basal factors initiate transcription by RNA polymerase II. J.Biol.Chem. 269:18414-18421.

PARVIN, J.D. et P.A. SHARP. 1993. DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. Cell 73:533-540.

PETERSON, M.G., N. TANESE, B.F. PUGH et R. TJIAN. 1990. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. Science 248:1625-1630.

PINTO, I., W-H. WU, J.G. NA et M. HAMPSEY. 1994. Characterization of *sua7* mutations defines a domain of TFIIB involved in transcription start site selection in yeast. J. Biol. Chem. 269:30569-30573.

POON, D., A.M. CAMPBELL, Y. BAI et P.A. WEIL. 1994. Yeast TAF170 is encoded by MOT1 and exists in a TATA box-binding protein (TBP)-TBP-associated factor complex distinct from transcription factor IID. J. Biol. Chem. 269:23135-23140.



PRICE, D.H., A.E. SLUDER et A.L. GREENLEAF. 1989. Dynamic interaction between a *Drosophila* transcription factor and RNA polymerase II. Mol. Cell. Biol. 9:1465-1475.

PTASHNE, M. ET A. GANN. 1997. Transcriptional activation by recruitment. Nature 386: 569-577.

PUGH, B.F. et R. TJIAN. 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: Evidence for coactivators. Cell 61:1187-1197.

RANISH, A.J. et S. HAHN. 1991. The yeast general transcription factor TFIIA is composed of two polypeptide subunits. J. Biol. Chem. 266:19320-19327.

RANISH, A.J., S. LANE et S. HAHN. 1992. Isolation of two genes that encode subunits of the yeast transcription factor IIA. Nature 255:1127-1129.

REESE, J.C., L. APONE, S.S. WALKER, L.A. GRIFFIN et M.R. GREEN. 1994. Yeast TAF<sub>II</sub>s in a multisubunit complex required for activated transcription. Nature 371:523-527.

REINES, D., J.W. CONAWAY et R.C. CONAWAY. 1996. The RNA polymerase II general elongation factors. Trends Biochem. Sci. 21:351-356.

ROBERT, F., M. DOUZIECH, D. FORGET, J.M. EGLY, J. GREENBLATT, Z.F. BURTON et B. COULOMBE. 1998. Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIF. Mol. Cell 2:341-351.

ROBERT, F., D. FORGET, J. LI, J. GREENBLATT et B. COULOMBE. 1996. Localization of subunits of transcription factors IIE and IIF immediately upstream of the transcriptional initiation site of the adenovirus major late promoter. J. Biol. Chem. 271:8517-8520.

ROBERTS, S.G.E. et M.R. GREEN. 1994. Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB. Nature 371:717-720.

SAMUELS, M., A. FIRE et P.A. SHARP. 1992. Separation and characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II. J. Biol. Chem. 257:14419-14427.

SAUER, F., D.A. WASSARMAN, G.M. RUBIN et R. TJIAN. 1996. TAF<sub>II</sub>s mediate activation of transcription in the *drosophila* embryo. Cell 87:1271-1284.

SAUER, F., S.K. HANSEN et R. TJIAN. 1995a. Multiple TAF<sub>II</sub>s directing synergistic activation of transcription. Science 270:1783-1788.

SAUER, F., S.K. HANSEN et R. TJIAN. 1995b. DNA template and activator-coactivator requirements for transcriptional synergism by *Drosophila* bicoid. *Science* 270:1825-1828.

SAWADOGO, M. et R.G. ROEDER. 1985. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 43:165-175.

SHI, X., M. CHANG, A.J. WOLF, C.H. CHANG, A.A. FRAZER-ABEL, P.A. WADE, Z.F. BURTON et J.A. JAEHNING. 1997. Cdc73p and Paf1p are found in a novel RNA polymerase II-containing complex distinct from the Srbp-containing holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.* 17:1160-1169.

SHYKIND, B.M., J. KIM et P.A. SHARP. 1995. Activation of the TFIID-TFIIA complex with HMG-2. *Genes & Dev.* 9:1354-1365.

SHYKIND, B.M., J. KIM, L. STEWART, J.J. CHAMPOUX et P.A. SHARP. 1997. Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes & Dev.* 11:397-407.

SMALE, S.T. 1997. Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1351:73-88.

STARGELL, L.A. et K. STRUHL. 1995. The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators *in vivo*. *Science* 269:75-78.

STARGELL, L.A. et K. STRUHL. 1996. A new class of activation-defective TATA-binding protein mutants: evidence for two steps of transcriptional activation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 16:4456-4464.

STRINGER, K.F., C.J. INGLES et J. GREENBLATT. 1990. Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* 345:783-786.

SUN, X., D. MA, M. SHELDON, K. YEUNG et D. REINBERG. 1994. Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polypeptides: a role in TFIID-mediated transcription. *Genes & Dev.* 8:2336-2348.

SUN, Z-W. et M. HAMPSEY. 1995. Identification of the gene (SSU71/TFG1) encoding the largest subunit of transcription factor TFIIF as a suppressor of a TFIIB mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3127-3131.

SUN, Z-W., A. TESSMER et M. HAMPSEY. 1996. Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 24:2560-2566.

TAN, S., R.C. CONAWAY et J.W. CONAWAY. 1995. Dissection of transcription factor TFIIF functional domains required for initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6042-6046.

TAN, S., Y. HUNZIKER, D.F. SARGENT et T.J. RICHMOND. 1996. Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Nature* 381:127-134.

TANESE, N., B.F. PUGH et R. TJIAN. 1991. Coactivators for a proline activator purified from the multisubunit human TFIID complex. *Genes & Dev.* 5:2212-2224.

TANSEY, W.P. et W. HERR. 1997. TAFs: Guilt by association? *Cell* 88:729-732.

TANTIN, D. et M. CAREY. 1994. A heteroduplex template circumvents the energetic requirement for ATP during activated transcription by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 269:17397-17400.

THOMPSON, C.M., A.J. KOLESKE, D.M. CHAO et R.A. YOUNG. 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73:1361-1375.

THOMPSON, C.M. et R.A. YOUNG. 1995. General requirement for RNA polymerase II holoenzymes *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4587-4590.

TIMMERS, H.Th.M. 1994. Transcription initiation by RNA polymerase II does not require hydrolysis of the  $\beta$ - $\gamma$  phosphoanhydride bond of ATP. *EMBO J.* 13:391-399.

TRIEZENBERG, S.J. 1995. Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 5:190-196.

TYREE, C.M., C.P. GEORGE, L.M. LIRA-DEVITO, S.L. WAMPLER, M.E. DAHMUS, L. ZAWEL et J.T. KADONAGA. 1993. Identification of a minimal set of proteins that is sufficient for accurate initiation of transcription by RNA polymerase II. *Genes & Dev.* 7:1254-1265.

USHEVA, A., E. MALDONADO, A. GOLDRING, H. LU, C. HOUBAVI, D. REINBERG et Y. ALONI. 1992. Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell* 69:871-881.

USHEVA, A. et T. SHENK. 1994. TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* 76:1115-1121.

VERRIJZER, C.P., J-L. CHEN, K. YOKOMORI et R. TJIAN. 1995. Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* 81:1115-1125.

VERRIJZER, C.P., K. YOKOMORI, J-L CHEN et R. TJIAN. 1994. *Drosophila* TAF<sub>II</sub>150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science* 264:933-941.

WADE, P.A., W. WEREL, R.C. FENTZKE, N.E. THOMPSON, J.F. LEYKAM, R.R. BURGESS, J.A. JAEHNING et Z.F. BURTON. 1996. A novel collection of accessory factors associated with yeast RNA polymerase II. *Protein Expr. Purif.* 8:85-90.

WALKER, S.S., J.C. REESE, L.M. APONE et M.R. GREEN. 1996. Transcription activation in cells lacking TAF<sub>II</sub>s. *Nature* 383: 185-188.

WANG, B.Q. et Z. BURTON. 1995. Functional domains of human RAP74 including a masked polymerase binding domain. *J. Biol. Chem.* 270:27035-27044.

WANG, W., J.D. GRALLA et M. CAREY. 1992. The acidic activator GAL4-AH can stimulate polymerase II transcription by promoting assembly of a closed complex requiring TFIID and TFIIA. *Genes & Dev.* 6:1716-1727.

WEIL, P.A., D.S. LUSE, J. SEGALL et R.G. ROEDER. 1979. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18:469-484.

WEIDEMAN, C.A., R.C. NETTER, L.R. BENJAMIN, J.J. MCALLISTER, L.A. SCHMIEDEKAMP, R.A. COLEMAN et B.F. PUGH. 1997. Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA. *J. Mol. Biol.* 271:61-75.

WHITE, R.J., B.C.-E. KHOO, J.A. INOSTROZA, D. REINBERG et S.P. JACKSON. 1994. Differential regulation of RNA polymerase I, II, and III by the TBP-binding repressor Dr1. *Science* 266:448-450.

WILSON, C.J., D.M. CHAO, A.N. IMBALZANO, G.R. SCHNITZLER, R.E. KINGSTON et R.A. YOUNG. 1996. RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84:235-244.

WOLFFE, A.P. et D. PRUSS. 1996. Targeting chromatin disruption: transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84:817-819.

WORKMAN, J.L. et R.G. ROEDER. 1987. Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* 51:613-622.



XIE, X., T. KOKUBO, S.L. COHEN, U.A. MIRZA, A. HOFFMANN, B.T. CHAIT, R.G. ROEDER, Y. NAKATANI et S.K. BURLEY. 1996. Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature* 380:316-322.

XIAO, H., J.D. FRIESEN et J.T. LIS. 1995. Recruiting TATA-binding protein to a promoter: transcriptional activation without an upstream activator. *Mol. Cell. Biol.* 15:5757-5761.

XIAO, H., A. PEARSON, B. COULOMBE, R. TRUANT, S. ZHANG, J.L. REGIER, S.J. TRIEZENBERG, D. REINBERG, O. FLORES, C.J. INGLES et J. GREENBLATT. 1994. Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol. Cell. Biol.* 14:7013-7024

YANKULOV, K., J. BLAU, T. PURTON, S. ROBERTS et D.L. BENTLEY. 1994. Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell* 77:749-759.

YOKOMORI, K., A. ADMON, J.A. GOODRICH, J-L. CHEN et R. TJIAN. 1993. *Drosophila* TFIID-L is processed into two subunits that are associated with TBP/TAF complex. *Genes & Dev.* 7:2235-2245.

YOKOMORI, K., M.P. ZEIDLER, J-L. CHEN, C.P. VERRIJZER, M. MLODZIK et R. TJIAN. 1994. *Drosophila* TFIID directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes & Dev.* 8:2313-2323.

ZAWEL, L. et D. REINBERG. 1993. Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 44:67-108.

ZAWEL, L., K. P. KUMAR et D. REINBERG. 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes & Dev.* 9:1479-1490.

ZEHRING, W.A., J.M. LEE, J.R. WEEKS, R.S. JOKERST et A.L. GREENLEAF. 1988. The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential *in vivo* but is not required for accurate transcription initiation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3698-3702.

ZHOU, Q., P.M. LIEBERMAN, T.G. BOYER et A.J. BERK. 1992. Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter. *Genes & Dev.* 6:1964-1974.

ZHU, H., V. JOLIOT et R. PRYWES. 1994. Role of transcription factor TFIIF in serum response factor-activated transcription. *J. Biol. Chem.* 269:3489-3497.